

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



In vitro analýza améboidně-mezenchymálního přechodu
A375M2 melanomových buněk

In vitro analysis of amoeboid-mesenchymal transition of
A375m2 melanoma cells

Lenka Kasalová
2010

školitel: RNDr. Daniel Rösler, PhD.

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma *In vitro* analýza améboidně-mezenchymálního přechodu A375M2 melanomových buněk jsem vypracovala samostatně, s pomocí odborných konzultací se svým školitelem, a na základě citované odborné literatury.

září 2010

Lenka Kasalová

Tímto způsobem bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Danielovi Röselovi, PhD. za odborné konzultace a věcné rady, které mi poskytl během sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli a RNDr. Janu Brábkovi, PhD. za odborné rady a vedení během mého působení v laboratoři. Dále moje díky patří všem členům laboratoře za vytvoření příjemné atmosféry laboratoře a za jejich pomoc při pokusech. V neposlední řadě bych tímto způsobem chtěla poděkovat své rodině, která mi umožnila vystudovat tuto školu, která mě ve studiu podporovala a byla mojí oporou.

Abstrakt

Invazivita nádorových buněk je důležitým aspektem vývoje rakoviny. Individuální nádorové buňky vykazují v 3D prostředí minimálně dva typy invazivity a to invazivitu mezenchymální a invazivitu améboidní. Buňky mohou v závislosti na jejich stavu a okolním prostředí mezi těmito způsoby invazivity přepínat. Améboidně-mezenchymální přechod je oproti mezenchymálně-améboidnímu přechodu méně prostudován. Provedli jsme proteomickou analýzu améboidně-mezenchymálního přechodu u melanomových buněk linie A375M2, který jsme indukovali inhibitorem kinázy ROCK Y27632 v 3D matrigelové matrici a ve 2D prostředí. Indukce tohoto přechodu ovlivnila expresi 92 proteinů a změnila hladinu fosforylace u 51 proteinů. Pouze u 17 proteinů byla exprese a u 8 proteinů fosforylace změněna shodně ve 2D i 3D prostředí. Zjistili jsem, že PKC α reguluje améboidní migraci, a její inhibice inhibitorem Gö6976 vede k améboidně-mezenchymálnímu přechodu. Analýza proteomických dat dále ukázala, že indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem kinázy ROCK vede k aktivaci antiapoptotických signálů a signálních drah regulujících aktinový cytoskelet a především fokální adheze.

Klíčová slova

buněčná migrace, améboidně-mezenchymální přechod, mezenchymálně-améboidní přechod, proteomická analýza, PKC α

Abstract

The invasion of cancer cells is an important aspect of cancer progression. Single tumor cells exhibit at least two types of invasion in 3D environment, mesenchymal and amoeboid invasion. Tumor cells can switch between these two modes of movement depending on cellular status and surrounding environment. Amoeboid-mesenchymal transition (AMT) is less explored than mesenchymal-amoeboid transition (MAT). We performed a proteomic analysis of amoeboid-mesenchymal transition of human melanoma cell line A375M2. We have induced amoeboid-mesenchymal transition by treatment with a ROCK inhibitor Y27632 in 3D matrigel matrices and in 2D environment. Induction of the amoeboid-mesenchymal transition has changed a level of expression of 92 proteins and a level of phosphorylation of 15 proteins. Expression of only 17 proteins and phosphorylation of 8 proteins was identically changed in both of these environments. We found that PKC α regulates amoeboid migration and that treatment of cells with a PKC α inhibitor Gö6976 induces amoeboid-mesenchymal transition. Analysis of the proteomics data have further shown that induction of AMT by the ROCK inhibitor Y27632 leads to activation of antiapoptotic signals and activation of signaling pathways involved in regulation of actin cytoskeleton especially regulation of focal adhesions.

Key words

cell migration, amoeboid-mesenchymal transition, mesenchymal-amoeboid transition, proteomic analysis, PKC α

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Obsah	6
Seznam zkratk	8
1. Literární úvod	11
1.1. Mezenchymální invazivita	12
1.2. Améboidní invazivita	15
1.3. Shrnutí: Améboidní versus mezenchymální migrace	19
1.4. Mezenchymálně-améboidní přechod (MAT)	19
1.4.1. Proteolytická remodelace ECM	20
1.4.2. β -integrinová signalizace	21
1.4.3. Vliv architektury ECM na MAT	22
1.4.4. Signalizace prostřednictvím Rac	22
1.4.5. Rho/ROCK signalizace	24
1.4.6. Mikrotubuly	26
1.4.7. Signalizace prostřednictvím neuropilinu a p130Cas	27
1.5. Améboidně-mezenchymální přechod (AMT)	27
1.5.1. Rho signalizace	28
1.5.2. Rac signalizace	29
1.5.3. Cdc42 signalizace	29
1.5.4. Kofilin	30
2. Materiál a metody	31
2.1. Materiál	31
2.1.1. Modelový organismus	31
2.1.2. Roztoky pro kultivaci savčích buněk	31
2.1.3. Roztoky pro přípravu proteinových lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE	32
2.1.4. Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot	32
2.1.5. Seznam primárních protilátek	33
2.1.6. Seznam sekundárních protilátek	33
2.1.7. Složky pro přípravu kolagenových a matrigelových maticí	34
2.1.8. Složky pro přípravu želatinem pokrytých sklíček a jejich fixaci	34
2.1.9. Roztoky pro přípravu zymografie	35
2.2. Metody	35
2.2.1. Pasážování buněk	35
2.2.2. Příprava stabilátů savčích buněk	36
2.2.3. Rozpěstování stabilátů savčích buněk	36
2.2.4. Příprava proteinových lyzátů z tkáňových kultur	36
2.2.5. Stanovení proteinové koncentrace Folinovou metodou	37
2.2.6. Příprava vzorků pro SDS-PAGE	38
2.2.7. Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)	38
2.2.8. Western blot	39
2.2.9. Imunodetekce proteinů na membráně	39
2.2.10. Stripování membrány western blotů	40
2.2.11. Příprava kolagenu pro pozorování v 3D prostředí	41
2.2.12. Příprava matrigelu pro pozorování buněk v 3D prostředí a pro přípravu proteinových lyzátů z 3D prostředí	42

2.2.13.	Rozpouštění matrigelové matrice	42
2.2.14.	Příprava buněk pro proteomickou analýzu firmou Kinexus	43
2.2.15.	Příprava sklíček pokrytých želatinem konjugovaným s fluorescenční značkou AlexaFluor633.....	45
2.2.16.	Fixace sklíček.....	45
2.2.17.	Zymografie.....	46
3.	Výsledky.....	47
3.1.	Indukce améboidně-mezenchymálního přechodu melanomových buněk A375M2 pomocí inhibitoru kinázy ROCK Y27632.....	47
3.1.1.	Testování morfologie v 3D kolagenu	48
3.1.2.	Testování morfologie v 3D matrigelu.....	49
3.2.	Rozpuštění matrigelových maticí a získání buněk z 3D prostředí.....	54
3.3.	Příprava buněk A375M2 pro proteomickou analýzu	55
3.4.	Proteomická analýza A375M2 provedená firmou Kinexus.....	56
3.5.	Výsledek proteomické analýzy	57
3.6.	KEGG databáze (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).....	58
3.7.	Ověření signifikantnosti výsledků proteomické analýzy.....	59
3.8.	MAPK dráha	66
3.9.	Přítomnost proteolytických enzymů a proteolytické degradace	66
	Diskuse	71
	Závěr	79
	Seznam použité literatury	80
	Příloha 1	93
	Příloha 2.....	101

Seznam zkratek

- 293 - lidské embryonální jaterní buňky
- A311 - linie krysích sarkomových buněk
- A375M2 - lidské melanomové buňky s vysokým metastatickým potenciálem
- A375p - parentální linie buněk A375M2
- Akt - serin-threoninová protein kináza, synonymum PKB
- AMT - améboidně-mezenchymální přechod (amoeboid-mesenchymal transition)
- ARHGAP22 - GAP protein Rac GTPázy
- ATM - serinová protein kináza (ataxia telangiectasia mutated)
- Bad - proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2 antagonist of cell death)
- Bak - proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
- Bax - proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
- BE buňky - buňky kolorektálního karcinomu
- Bcl-xL - antiapoptotický protein rodiny Bcl-2
- Bcl-xS/L - antiapoptotický proteiny rodiny Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-xS)
- Cdc42 - člen Rho rodiny GTPáz
- CDK - cyklin dependentní kináza (cyclin dependent kinase)
- DOCK - GEF protein Cdc42 GTPázy (dedicator of cytokinesis protein)
- E2F - transkripční faktor
- ECM - extracelulární matrix (extracellular matrix)
- EMT - epitelo-mezenchymální přechod (epithelial-mesenchymal transition)
- EphA2 - efrinový receptor A2, receptorová tyrosin kináza (ephrin type-A receptor 2)
- Erk5 - MAP kináza (extracellular signal-regulated kinase 5)
- ERM - rodina proteinů ezrin, radixin, meosin
- FAK - kináza fokálních adhezí (focal adhesion kinase)
- F-aktin - filamentární aktin
- FBS - fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
- GAP - proteiny stimulující GTPázovou aktivitu G proteinů (guanine nucleotide triphosphatase-activating protein)
- GEF - proteiny zajišťující aktivitu G proteinů výměnou GDP za GTP (guanine nucleotide exchange factor)
- GSK3 β - glykogen syntáza kináza (Glycogen synthase kinase 3 β)

GTPáza - proteiny vážící a hydrolyzující GTP (GTPase – guanine nucleotide triphosphatase)

HT1080 - linie lidských fibrosarkomových buněk

IAP - inhibitor apoptózy (inhibitor of apoptosis protein 1)

KEGG - online databáze (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

LIMK - protein kináza s LIM doménami (LIM domain kinase)

MAT - mezenchymálně-améboidní přechod (mesenchymal-amoeboid transition)

MDA-MB231 - buněčná linie rakoviny prsu

MEF - myší embryonální fibroblasty (Mouse Embryonic Fibroblast)

MLC - lehký řetězec myosinu (myosin light chain)

MLCK - kináza lehkého řetězce myosinu (myosin light chain kinase)

MLCP - fosfatáza lehkého řetězce myosinu (myosin light chain phosphatase)

MMP - matrixová metaloproteáza (matrix metalloproteinase)

MRCK - kináza regulačního řetězce myosinu (myosin regulatory chain kinase)

MT1-MMP - membránově vázaná matrixová metaloproteáza (membrane targeted- matrix metalloproteinase)

MTLn3 - linie krysích buněk prsního adenokarcinomu

MTOC - organizační centrum mikrotubulů (microtubule-organizing center)

NEDD9 - adaptorový protein (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9)

NIK - Nck interakční kináza (Nck-interacting kinase)

NRP1 - neuropilin (neuropilin)

N-WASP - rodina proteinů neurální-Wiskott-Aldrichova syndromu (neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein)

p130Cas - adaptorový protein (Cas (Crk-associated substrate) scaffolding protein family member 1)

PAK - p21 aktivovaná kináza (p21-activated kinases)

PDK1 - fosfoinositol dependentní protein kináza (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)

PKB - protein kináza B (protein kinase B)

PKC - protein kináza C (protein kinase C)

Plk1 - serin-threoninová protein kináza (Polo-like protein-serine kinase 1)

PtdInsP₃ - fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát

PTEN - fosfatáza (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase)

Rac1 - GTPáza rodiny Rho

Rb - retinoblastomový protein (Retinoblastoma-associated protein)

RhoA - GTPáza Rho rodiny

RhoE - člen Rho rodiny GTPáz, synonymum Rnd3

Rnd3 - člen Rho rodiny GTPáz, synonymum RhoE

ROCK - kináza závislá na Rho (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase)

SMC - protein komplexu kohezinů (Structural maintenance of chromosomes proteins)

Smurf - E3 ubiquitin-protein ligáza (Smad ubiquitination regulatory factor)

Src - nереceptorová tyrosinová kináza (steroid receptor coactivator)

TESK - testikulární protein kináza (testicular protein kinase 1)

U87MG - linie lidských gliomových buněk

uPa - serinová proteáza urokinázového typu (urokinase plasminogen activator)

uPAR - receptor pro uPa (urokinase plasminogen activator (uPA)-receptor)

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

WASP - rodina proteinů Wiskott-Aldrichova syndromu (Wiskott-Aldrich syndrome protein)

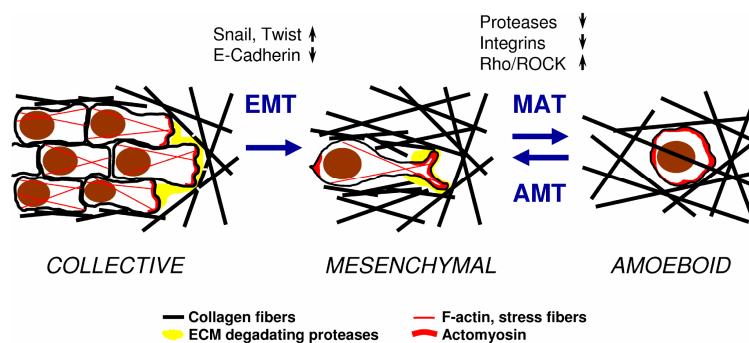
WAVE - protein rodiny WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein family Verprolin-homologous protein)

ZIPK - serin-threoninová protein kináza (Zipper interacting protein kinase)

1. Literární úvod

Invazivita nádorových buněk je klíčový krok při tvorbě metastáz. Tvorba metastáz neboli metastatická kaskáda je komplexní proces zahrnující několik po sobě jdoucích kroků. Buňky musí migrovat z primárního nádoru do okolní tkáně, následně intravazací proniknout do cévního či lymfatického řečiště a v tomto prostředí přežít. Dalším krokem je extravazace do tkáně na jiném místě organismu a vytvoření sekundárního nádoru (shrnutí v Kopfshtein a Christofori, 2006). Přesný molekulární mechanismus procesu tvorby metastáz není zatím zcela objasněn.

V 3D prostředí rozlišujeme minimálně dva způsoby invazivity nádorových buněk a to invazivitu kolektivní a invazivitu individuální. Pro kolektivní invazivitu je typická migrace skupiny buněk, které jsou propojeny mezibuněčnými spoji (Friedl a Gilmour, 2009). Tato práce se zabývá pouze individuální invazivitou nádorových buněk, kterou můžeme dále rozdělit na invazivitu mezenchymální a améboidní. Způsob invazivity závisí na typu buněk, na jejich stavu a na podmínkách okolního prostředí. Buňky mohou přecházet mezi těmito dvěma individuálními strategiemi migrace (shrnutí v Paňková *et al.*, 2010). Aktivace nebo naopak inhibice určitých signálních drah vede jak k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (MAT), tak i k améboidně-mezenchymálnímu přechodu (AMT) (obr.1). K těmto přechodům individuálních invazit dochází velice rychle, na rozdíl od epitel-mezenchymálního přechodu (EMT), který je doprovázen výraznými změnami na transkripční úrovni (shrnutí v Kopfshtein a Christofory, 2006). Pochopení přesných molekulárních mechanismů těchto způsobů invazit a pochopení molekulárních mechanismů těchto přechodů AMT, MAT i EMT je důležité pro účinnou léčbu nádorových onemocnění. Neboť právě tvorba metastáz je hlavním důvodem úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním.



Obr.1. Schematické znázornění jednotlivých přechodů invazivit nádorových buněk (převzato z Brábek *et al.*, 2010). Epitelo-mezenchymální přechod (EMT) je indukován inhibicí transkripčních faktorů Snail a Twist, která vede ke snížení E-kadherinů a ke ztrátě mezibuněčných spojů. Inhibice proteolytické degradace ECM, inhibice integrinové signalizace, nebo aktivace Rho/ROCK signalizace vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (MAT). Inhibice Rho/ROCK signalizace vede naopak k améboidně-mezenchymálnímu přechodu (AMT).

1.1. Mezenchymální invazivita

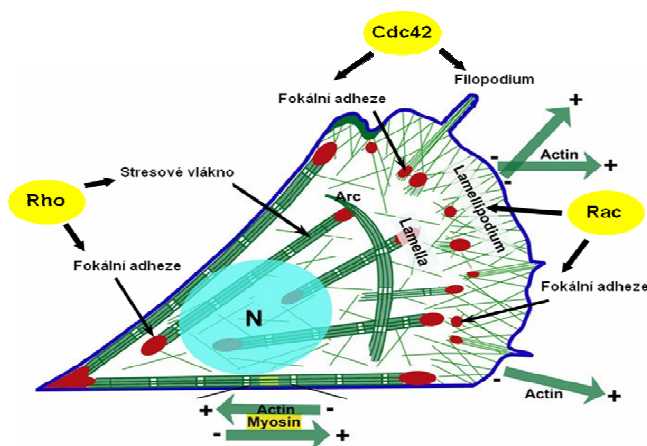
Mezenchymální typ invazivity má podobné znaky jako migrace fibroblastů, keratinocytů a endoteliálních buněk (Lauffenburger a Horwitz, 1996). Buňky vykazující mezenchymální typ invazivity mají protáhlý tvar (obr.5) a v 3D prostředí jsou polarizované. Na předním konci neboli „leading edge“ mají jedno nebo několik pseudopodií, následuje tělo buňky a retrahující konec. Ve 2D i 3D prostředí pozorujeme na buňkách přítomnost filopodií, na 2D substrátu buňky tvoří lamelipodia, v 3D matrici buňky tvoří pseudopodia, což jsou funkční ekvivalenty lamelipodií. Tvorba těchto tří struktur je závislá na malých GTPázách rodiny Rho, především na Rac a Cdc42 (Ridley *et al.*, 1992; Nobes a Hall, 1995) (obr.2).

Cdc42 reguluje tvorbu filopodií (Nobes a Hall, 1995; Yang *et al.*, 2006), což jsou tenké výběžky na povrchu buňky zodpovědné za rozpoznávání gradientu chemoatraktantů (Lidke *et al.*, 2005). Cdc42 reguluje polaritu aktinového a mikrotubulového cytoskeletu (Cau a Hall, 2005). Cdc42 během polarizovaného pohybu buňky orientuje organizační centrum mikrotubulů (MTOC) a Golgiho aparát (Ridley, 2001). Cdc42 reguluje také tvorbu fokálních adhezí (Nobes a Hall, 1995).

Rac1 je protein důležitý pro tvorbu lamelipodií (Ridley *et al.*, 1992) a pseudopodií (Dharmawardhane *et al.*, 1999). Rac1 reguluje tvorbu fokálních adhezí na vedoucím okraji buňky (Nobes a Hall, 1995). V myších embryonálních fibroblastech (MEF) je

Rac1 signalizace důležitá i pro tvorbu stresových vláken regulovaných RhoA aktivitou (Guo *et al.*, 2006).

Signalizace zprostředkovaná RhoA reguluje v mezenchymálně se pohybujících buňkách tvorbu aktomyosinových stresových vláken (Nobes a Hall, 1995). Rho/ROCK signalizace reguluje i tvorbu fokálních adhezí v místech ukotvení stresových vláken k membráně (Amano *et al.*, 1997; Totsukawa *et al.*, 2004).



Obr.2. Schéma působení GTPáz rodiny Rho na aktinový cytoskelet (převzato a upraveno z webových stránek Vic Small laboratory, Austrian Academy of Sciences in Salzburg and Vienna <http://cellix.imba.oeaw.ac.at/>).

Mezenchymální migrace zahrnuje pět kroků, které se cyklicky opakují (Friedl, 2004; Wolf a Friedl, 2006).

1. Polymerace aktinu indukující polarizaci buňky a tvorbu pseudopodií.
2. Tvorba fokálních adhezí mezi buňkou a ECM zprostředkovaná β -integriny, přesun adaptorových, signálních, cytoskeletálních, případně proteolytických proteinů do fokálních adhezí.
3. Lokální proteolýza ECM zprostředkovaná proteázami (př. MT-MMP, uPA).
4. Interakce aktinového skeletu s kontraktilními proteiny (př. myosin II.). Kontrakce stresových vláken zajišťující trakční sílu mezi předním a zadním koncem buňky.
5. Posun buňky daným směrem.

Polymerace aktinu na vedoucím okraji buňky je regulována malými GTPázami Rac a Cdc42. Tyto GTPázy regulují proteiny WASP rodiny (Wiskontt-Aldrich syndrome proteins) (Miki *et al.*, 1998; Rohatgi *et al.*, 1999), která zahrnuje proteiny WASP,

N-WASP a WAVE (Miki *et al.*, 1998). WASP proteiny regulují Arp2/3 (Actin-related protein), tvoří spolu proteinový komplex, který ovlivňuje tvorbu aktinové sítě na vedoucím okraji buňky (Suetsugu *et al.*, 2001). Signalizace zprostředkovaná Rac1/WAVE2/Arp2/3 je důležitá pro formování lamelipodií (Yamazaki *et al.*, 2003) i pro tvorbu pseudopodií (Yamazaki *et al.*, 2009). Tvorba filopodií je regulována Cdc42/N-WASP/Arp2/3 (Carlier *et al.*, 1999).

Buňky se pohybují na základě trakční síly, která je generována aktomyosinovými stresovými vlákny, ukotvenými v místech interakce buňky se substrátem, neboli fokálních adhezích (Sheetz *et al.*, 1998). Trakční síla generovaná aktomyosinovými stresovými vlákny je regulována podobnými mechanismy, jako níže popsaná regulace kontrakce aktomyosinového kortexu.

Kromě fokálních adhezí kotvící stresová vlákna regulována Rho/ROCK signalizací jsou v buňce i další fokální kontakty, které zprostředkovávají ukotvení buňky k substrátu a stabilizují lamelipodia, pseudopodia a filopodia. Fokální adheze jsou tvořeny integriny, které zprostředkovávají přímou interakci buňky s komponentami extracelulární matrix (Tamariz a Grinnell, 2002). Integriny jsou heterodimerní receptory složené z α a β podjednotek. V plazmatické membráně jsou integriny uspořádávány do klastrů pomocí proteinu talinu (Calderwood *et al.*, 1999). Do fokálních adhezí jsou lokalizovány i proteolytické enzymy, které způsobují degradaci ECM (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Brooks *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1996). Součástí fokálních adhezí jsou kromě integrinů a proteolytických enzymů ještě signální a adaptorové proteiny. Tyto proteiny jako je α -aktinin, talin, tensin, vinkulin, paxilin, kináza fokálních adhezí (FAK), Src a další zprostředkovávají interakci integrinů s aktinovými vlákny a stabilizují strukturu fokálního kontaktu (shrnutí v Zaidel-Bar *et al.*, 2004).

Mezenchymální invazivita je závislá na proteolytické degradaci a remodelaci extracelulární matrix (ECM) pomocí široké škály enzymů (metaloпротеáz, katepsinů a serinových proteáz) (Birkedal-Hansen; 1995). Tyto enzymy degradují okolní ECM a tvoří cestu, kterou nádorové buňky migrují (Murphy a Gavrilovic, 1999; Friedl a Bröcker, 2000; Wolf a Friedl, 2005). Proteolytická aktivita je lokalizována v oblasti několika mikrometrů za aktinovou polymerací pseudopodií (Wolf *et al.*, 2007; Tolde *et al.*, 2010). V mnoha nádorových buňkách je aktivita proteolytických enzymů zvýšena, jak přesně je však regulována aktivita ECM degradujících proteáz není zatím zcela objasněno.

Buňky se pohybují rychlostí 0,1-1 μ m/min, což je v porovnání s améboidní invazivitou poměrně nízká rychlost (Friedl *et al.*, 1998; Friedl a Wolf, 2003). Tato rychlost je dána výskytem značného množství fokálních adhezí, které mají určitou dobu života a tím migraci brzdí (Palecek *et al.*, 1997). Dynamika fokálních adhezí je zajištěna fosforylací komponent těchto struktur pomocí tyrosinových kináz a proteolýzou komponent fokálních adhezí. Klíčové je štěpení talinu prostřednictvím kalpainu (Franco *et al.*, 2004).

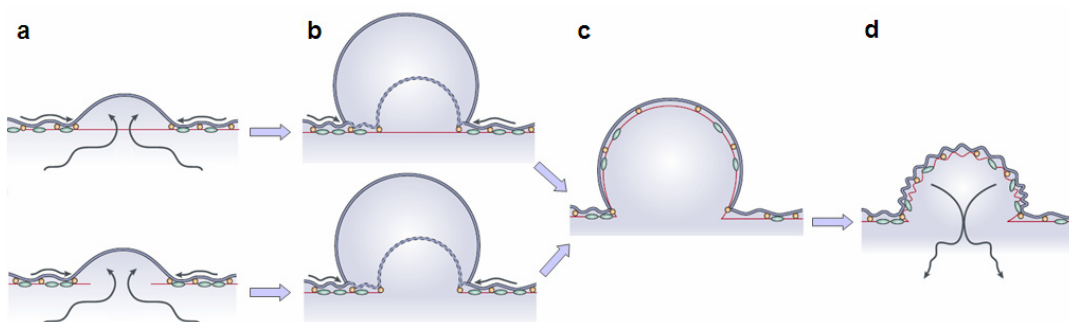
1.2. Améboidní invazivita

Améboidní migrace byla primárně popsána a studována na jednobuněčném stádiu hlenky *Dictyostelium discoideum* (Devreotes a Zigmond, 1988; Friedl *et al.*, 2001). U vyšších eukaryot se améboidní migrace vyskytuje u hematopoetických kmenových buněk, leukocytů a některých nádorových buněk (Mandeville *et al.*, 1997; Friedl *et al.*, 2001). Améboidní migrace je nezávislá na proteolytické degradaci ECM (Sahai a Marshall, 2003; Wilkinson *et al.*, 2005; Torka *et al.*, 2006; Wyckoff *et al.*, 2006). K průniku ECM využívají améboidně invadující buňky své schopnosti generovat větší trakční síly než buňky mezenchymálně invadující (Rösel *et al.*, 2008).

Buňky vykazující améboidní migraci mají v 3D prostředí kulatou morfologii (obr.5) a jsou charakteristické přítomností kortikálního aktinu. Dynamika kortikálního aktinu a kulatá morfologie buněk je regulována RhoA GTPázou a její efektorovou kinázou ROCK (Ishizaki *et al.*, 1996; Sahai a Marshall, 2002, 2003; Wyckoff *et al.*, 2006).

Na buněčném povrchu mají buňky dynamické struktury nazývané bleby, které jsou regulovány kinázou ROCK (Coleman *et al.*, 2001). Na rozdíl od filopodií, lamelipodií a pseudopodií tvorba blebů není závislá na aktinové polymeraci. Tvorba blebů je iniciována lokální disociací membrány od aktinového kortexu (Cunningham, 1995), nebo porušením aktinové sítě kortexu (Keller a Eggli, 1998) (obr.3a). Tyto změny struktury kortexu jsou způsobeny kontrakcí myosinu (Paluch *et al.*, 2005). Lokální odlišnosti kontraktility vedou k odlišnému tlaku na membránu, což způsobuje tvorbu blebů a změnu tvaru buňky (Lecuit a Lenne, 2007). Vlivem hydrostatického tlaku uvnitř buňky se cytoplazma tlačí ve směru porušení kortexu a vytvoří se nová struktura plazmatické membrány, bleb (Yanai *et al.*, 1996) (obr.3b). V nově vzniklém blebu se

tvoří nový aktinový kortex (Cunningham, 1995; Charras *et al.*, 2006) (obr.3c), který je schopen aktomyosinové kontrakce (obr.3d).



Obr.3. **Schematické znázornění tvorby blebu** (převzato a upraveno z Charras a Paluch, 2008)

a: porušení aktomyosinového kortexu

b: tvorba blebu vlivem hydrostatického tlaku uvnitř buňky

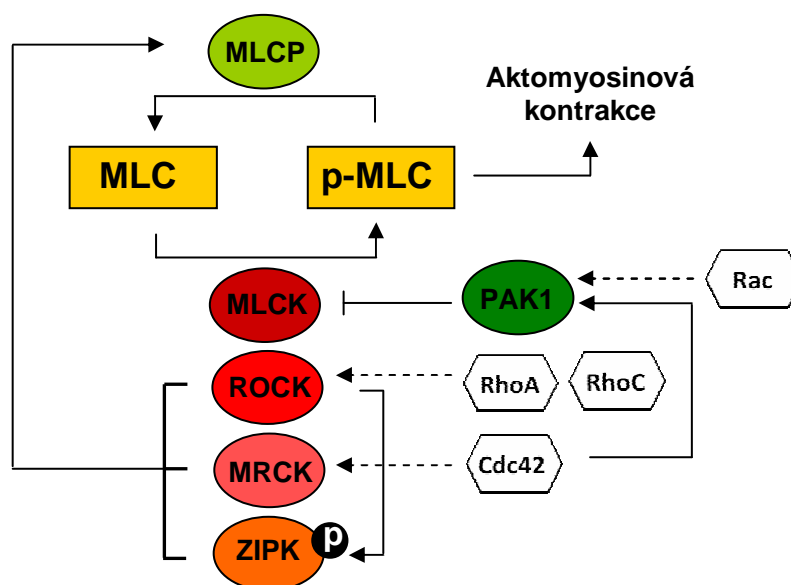
c: tvorba nového aktomyosinového kortexu pod povrchem plazmatické membrány blebu

d: kontrakce aktomyosinové sítě, kontrakce blebu

Kontrakce aktomyosinového kortexu je, na rozdíl od mezenchymální invazivity, zásadní pro generování motilní síly buňkami pohybujícími se améboidním způsobem (Yanai *et al.*, 1996; Mierke *et al.*, 2008). Kontraktilní síla kortikálního aktinu je generována myosinem II, který je aktivován fosforylací lehkého řetězce myosinu (MLC). Myosin II a MLC jsou v kortexu uloženy do svazků, které jsou umístěny kolmo ke směru pohybu buňky (Wyckoff *et al.*, 2006).

Fosforylace MLC a aktomyosinová kontraktilita je regulována Rho rodinou GTPáz RhoA, RhoC, Rac1, Cdc42 a jejich efektorovými kinázami (Zhao a Manser, 2005) (obr.4). Hladina fosforylovaného MLC je regulována jednak kinázami (MLCK, ROCK, ZIPK, MRCK) a jednak fosfatázou MLCP (mynosin light chain phosphatase). RhoA a RhoC aktivují kinázu ROCK (Ishizaki *et al.*, 1996; Sahai a Marshall, 2002), která jednak fosforyluje MLC (Amano *et al.*, 1996; Totsukawa *et al.*, 2000; Wyckoff *et al.*, 2006), a jednak inhibuje fosfatázu MLCP a tím brání defosforylaci MLC touto fosfatázou (Kimura *et al.*, 1996). ROCK dále fosforyluje a tím aktivuje kinázu ZIPK, která podobně jako ROCK fosforyluje MLC, a inhibuje MLCP (Hagerty *et al.*, 2007). Rac účinkuje opačně na fosforylaci MLC. Rac aktivuje kinázu PAK1 (p21-aktivated kinase 1), která inhibuje MLCK (Sanders *et al.*, 1999). Cdc42 signalizace jednak aktivuje, a jednak inhibuje fosforylaci MLC. Cdc42 aktivuje kinázu MRCK (mytotonic

dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase), která fosforyluje MLC (Leung *et al.*, 1998). MRCK také aktivuje fosforylaci MLC především v kooperaci s kinázou ROCK inhibicí MLCP (Wilkinson *et al.*, 2005). Význam Cdc42/MRCK dráhy podtrhuje i to, že u BE buněk kolorektálního karcinomu je signalizace prostřednictvím Cdc42/MRCK schopna kompenzovat ztrátu motility způsobené inhibicí Rho/ROCK dráhy (Wilkinson *et al.*, 2005). Signalizace Cdc42 interaguje také s PAK1 (Manser *et al.*, 1995), která inhibuje fosforylaci MLC.



Obr.4. Regulace fosforylace lehkého řetězce myosinu (MLC) proteiny Rho rodiny GTPáz a jejich efektorovými kinázami.

Kinázy ROCK a MLCK regulují odlišné subpopulace MLC, inhibice obou kináz vede téměř ke kompletní inhibici fosforylace MLC (Totsukawa *et al.*, 2004; Wyckoff *et al.*, 2006, Niggli *et al.*, 2006). Kináza MLCK není však schopna generovat dostatečně účinnou aktomyosinovou kontraktilní sílu, tato vlastnost je dominantně zprostředkována kinázou ROCK (Wyckoff *et al.*, 2006). Kromě fosforylace MLC kináza ROCK reguluje také lokalizaci a správnou orientaci MLC v buněčném kortexu (Wyckoff *et al.*, 2006). Kinázy ROCK a MLCK mají společnou vlastnost- fosforylovat MLC, ale liší se regulací buněčného tvaru, adheze, migrace a chemotaxe (Niggli *et al.*, 2006).

Aktomyosinová síť buněčného kortexu je k plazmatické membráně připojena proteiny rodiny ERM (ezrin/radixin/meosin) (Bretscher *et al.*, 2002). ERM proteiny jsou fosforylovány a aktivovány kinázou ROCK (Bretscher *et al.*, 2002), PKC α a kinázou NIK (shrnutí v Niggli a Rossy, 2008). ERM proteiny jsou důležité pro tvorbu

blebů (Sahai a Marshall, 2003). Především ezrin stabilizuje aktomyosinový kortex blebu zajišťující jeho kontrakci (Charras *et al.*, 2006).

Polarizace buněk kulatého tvaru nevykazuje orientaci Golgiho aparátu a MTOC jako je tomu u buněk protáhlého tvaru (Ridley, 2001). U buněk s kulatou morfologií je pozorováno asymetrické rozložení ezrinu ve směru pohybu buňky (Sahai a Marshall, 2003). Lokalizace ezrinu je závislá na RhoA aktivitě (Yonemura *et al.*, 2002) a je fosforylován kinázou ROCK (Bretscher *et al.*, 2002).

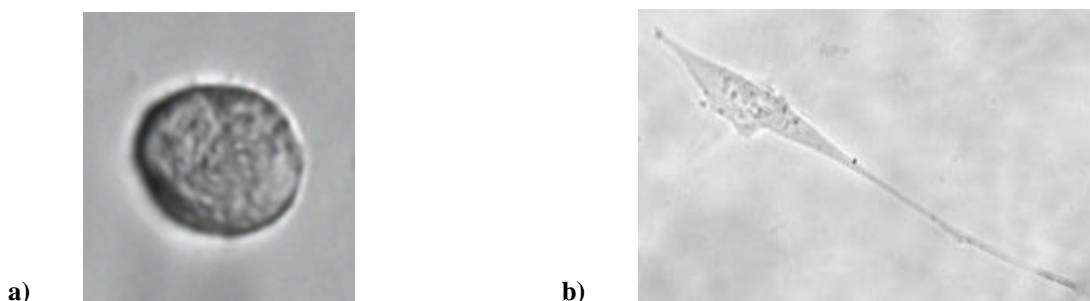
Aktomyosinová kontraktilní síla zprostředkovává aktivní protlačování améboidně invadující buňky kolagenovou sítí okolního prostředí (Friedl *et al.*, 1998, 2001; Wolf *et al.*, 2003; Wyckoff *et al.*, 2006). Buňky, kromě aktivního protlačování skrz mezery mezi vlákny kolagenu, tyto vlákna i deformují (Wyckoff *et al.*, 2006; Provenzano *et al.*, 2006, 2008; Rösel *et al.*, 2008), což může vést až k přeorganizování kolagenových vláken ECM z paralelně uložených vláken kolagenu na vlákna navzájem kolmá. Tato změna organizace kolagenových vláken závislá na Rho/ROCK signalizaci podporuje lokální migraci nádorových buněk (Provenzano *et al.*, 2006, 2008).

Améboidní migrace je asociována s vyšší rychlostí pohybu. V 3D prostředí se rychlost pohybuje od 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ u melanomových buněk A375M2 (Sahai a Marshall, 2003), až po rychlost 25 $\mu\text{m}/\text{min}$, která byla pozorována u lymfocytů v 3D kolagenových matricích (Friedl *et al.*, 1994). Vyšší rychlost améboidní migrace v porovnání s mezenchymální migrací je dána slabou interakcí buněk s ECM. Buňky netvoří masivní fokální adheze a β -integriny jsou difúzně rozptýleny po buněčném povrchu. Améboidní invazivita je na adhezi zprostředkované integriny závislá podstatně méně než invazivita mezenchymální (Carragher *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2003; Friedl *et al.*, 1998). Jak přesně buňky vykazující améboidní způsob invazivity interagují s extracelulární matrix je zatím nepopsáno, ale pravděpodobně využívají jiné typy glykoproteinů (Schmidt a Friedl, 2010).

1.3. Shrnutí: Améboidní versus mezenchymální migrace

AMÉBOIDNÍ MIGRACE	MEZENCHYMÁLNÍ MIGRACE
Kulatý tvar	Protáhlý tvar
Tvorba blebů	Tvorba pseudopodií, lamellipodií, filopodií
β -integriny difúzně v plazmatické membráně	β -integriny v klastrech, tvoří fokální adheze
Kortikální aktomyosinová síť	Stresová aktomyosinová vlákna
Rho/ROCK signalizace	Rac signalizace
Nezávislost na proteolytické degradaci ECM	Proteolytická degradace ECM
Rychlost pohybu 2-25 $\mu\text{m}/\text{min}$	Rychlost pohybu 0,1-1 $\mu\text{m}/\text{min}$

Tab.1. Porovnání klíčových rozdílů améboidní a mezenchymální migrace



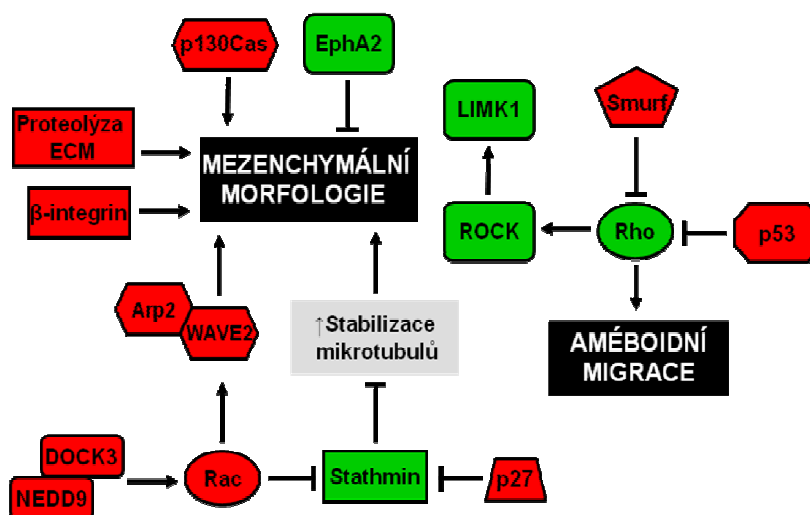
a)

b)

Obr.5. Ukázka typicky kulaté morfologie buněk vykazující améboidní migraci (a) a protáhlé morfologie buněk využívající mezenchymální způsob migrace (b) v 3D prostředí.

1.4. Mezenchymálně-améboidní přechod (MAT)

Agresivní nádorové buňky mohou využívat obě strategie invazivity (Wolf *et al.*, 2003, 2007; Wilkinson *et al.*, 2005; Wyckoff *et al.*, 2006). Záleží na typu a stavu buněk a na charakteru okolního prostředí (Provenzano *et al.*, 2008). Mezenchymálně-améboidní přechod je účinný únikový mechanismus nádorových buněk. Buňky jsou schopny kompenzovat zablokovanou mezenchymální migraci migrací améboidní (Wolf *et al.*, 2003; Sahai a Marshall, 2003; Maaser *et al.*, 1999). Buňky změny svoje fyziologické i morfologické vlastnosti, aby se mohly účinně rozšiřovat do okolní tkáně. Na obr.6 jsou znázorněny proteiny, jejichž inhibice respektive aktivace vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu.



Obr.6. *Proteiny zodpovědné za mezenchymálně-améboidní přechod.* (převzato a upraveno z Paňková *et al.*, 2010) Inhibice červeně označených proteinů a aktivace zeleně označených proteinů vede v 3D prostředí k mezenchymálně-améboidnímu přechodu invazivity nádorových buněk.

1.4.1. Proteolytická remodelace ECM

Invazivní nádorové buňky vykazující mezenchymální invazivitu degradují bariéry mezibuněčné hmoty a tím invadují do okolní tkáně. Proteázové inhibitory působící na metaloproteázy, katepsiny a serin/threoninové proteázy vedou k inhibici degradace okolního prostředí. Tato inhibice extracelulární proteolýzy vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Friedl, 2004; Wolf *et al.*, 2003; Wyckoff *et al.*, 2006; Carragher *et al.*, 2006). Metaloproteázy a katepsiny efektivně degradují hlavní složku pojivové tkáně, kterou jsou kolagenová vlákna (Montcourrier *et al.*, 1990; Aimes a Quigley, 1995). Proteolytickými enzymy jsou štěpeny i další substráty používané pro *in vitro* pokusy, jímž jsou matrigel, želatin a fibronectin. Po působení proteázových inhibitorů k degradaci okolního prostředí nedochází, buňky se pohybují nezávisle na proteolýze okolního substrátu (Wolf *et al.*, 2003). Indukce améboidní migrace u HT1080 buněk pomocí inhibitorů proteáz vede ke snížení exprese $\alpha 2\beta 1$ -integrinu a ke snížení hladiny fosforylované kinázy FAK (Carragher *et al.*, 2006).

Selhání léčby nádorových onemocnění inhibitory metaloproteáz naznačuje, že by mezenchymálně-améboidní přechod invazivity mohl hrát důležitou roli v nádorovém onemocnění (shrnutí v Ramnath a Creaven, 2004). V roce 2009 vyšla publikace, která zpochybňuje efektivitu mezenchymálně-améboidního přechodu pro úspěšnou invazivitu nádorových buněk v přítomnosti inhibitorů proteáz. Selhání léčby nádorových

onemocnění inhibitory proteáz autoři přičítají spíše nedostatečné koncentraci podávaných blokátorů proteáz (Sabeh *et al.*, 2009). Autoři dále zpochybňují běžně používané *in vitro* testování invazivity v 3D kolagenu (Sabeh *et al.*, 2009). Autoři upozorňují na podstatný rozdíl mezi *in vivo* kolagenem I a kolagenem používaným při *in vitro* pokusech. *In vitro* používaný kolagen I je extrahován pomocí pepsinu, takto proteolyticky získaný kolagen postrádá nehelikální telopeptidy na N- a C-koncích. Tyto telopeptidy obsahují oxidovatelné lysiny zprostředkovávající kovalentní spojení kolagenových vláken do stabilní gelové struktury. Kolagenové matrice z takto opracovaného kolagenu tedy postrádají další propojení a organizaci vláken kolagenu, která se vyskytuje v tkáni (Woodley *et al.*, 1991). Sabeh a kolektiv přisuzují *in vivo* pozorovanou améboidní migraci pouze specifickým podmínkám. Tvrdí, že tato migrace není efektivním způsobem šíření metastáz, a že tuto migraci nelze považovat za alternativní způsob šíření individuálních nádorových buněk. Autoři porovnávali migraci HT1080 a MDA-MB231 buněk v kolagenu extrahovaném pepsinem a v kolagenu propojeným kovalentními vazbami. Vyšší migrační rychlosti buňky dosahovaly v kolagenu extrahovaném pepsinem. Autoři usuzují, že invazivita nezávislá na proteolýze ECM je možná pouze v kolagenové matici, která není rigidně propojena kovalentními vazbami. Autoři však použili buňky, které se primárně pohybují mezenchymálním způsobem. Améboidní migrace je v těchto buňkách indukována například inhibitory proteáz, buňky však nejsou efektivně přizpůsobeny této migraci. K zpochybnění efektivity améboidní migrace by bylo vhodnější použít buňky, které primárně migrují améboidním způsobem (např. sarkomové buňky A311) a jsou této migraci geneticky přizpůsobeny (Paňková *et al.*, 2010).

1.4.2. β -integrinová signalizace

β -integrinová signalizace je základním znakem mezenchymální invazivity. Mezenchymálně-améboidní přechod je asociován se zeslabením adheze buněk zprostředkované integriny. Inhibice adheze zprostředkované β -integriny vede ke změně migrace na améboidní (Maaser *et al.*, 1999; Friedl, 2004). Ačkoli améboidní invazivita je nezávislá na β -integrinové signalizaci (Hegerfeldt *et al.*, 2002), inhibice β -integrinové signalizace nevede u všech buněk s mezenchymálním typem motility ke změně na améboidní motilitu. Inhibice β -integrinů u fibrosarkomových buněk HT1080 vede ke

ztrátě motility a nevede k přechodu na améboidní invazivitu (Wolf *et al.*, 2003; Carragher *et al.*, 2006).

1.4.3. Vliv architektury ECM na MAT

Architektura extracelulární matrix a především prostorová organizace vláken kolagenu ovlivňuje způsob invazivity nádorových buněk (Provenzano *et al.*, 2008). Buňky MDA-MB231 byly vysety ve vysoké hustotě do 3D kolagenového gelu. Kousek tohoto gelu byl vložen do čerstvého, isotropního, bezbuněčného kolagenového gelu. Za těchto podmínek se buňky MDA-MB231 rozšiřovaly do okolního gelu améboidní migrací za využití Rho/ROCK závislé kontraktilní síly, bez využití proteolytické degradace okolního substrátu (Provenzano *et al.*, 2008). Když byl kousek gelu vložen do anisotropního, tužšího gelu s navzájem propojenými vlákny kolagenu, buňky MDA-MB231 migrovaly mezenchymálním způsobem (Provenzano *et al.*, 2008).

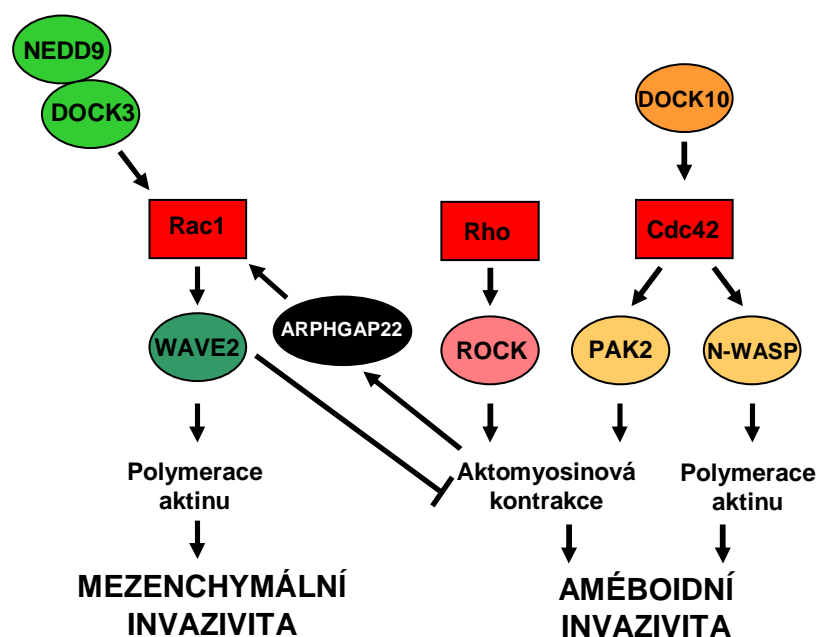
Závislost způsobu migrace na architektuře extracelulární matrix je pozorována i u lidských makrofágů (Van Goethem *et al.*, 2010). V matrici složené z vláken kolagenu typu I se makrofágy pohybují améboidním způsobem, v matrigelu a krystalizovaném kolagenu vykazují makrofágy mezenchymální migraci (Van Goethem *et al.*, 2010). Makrofágy přizpůsobují způsob migrace i tuhosti 3D matrice (Van Goethem *et al.*, 2010).

1.4.4. Signalizace prostřednictvím Rac

Rac GTPáza je klíčový regulátor tvorby lamelipodií a pseudopodií. Rac GTPáza je obecně považována za hlavní regulační protein mezenchymální invazivity. Inaktivace Rac vede jak v 2D tak v 3D prostředí k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Sanz-Moreno *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2009). V různých buněčných liniích je Rac signalizace odlišná. U primárně mezenchymálně invadujících MEF buněk a buněk glioblastomu U87M6 vede inaktivace Rac1 nebo inaktivace Rac signalizace ke ztrátě invazivity, ale nevede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Guo *et al.*, 2006, Yamazaki *et al.*, 2009). Naopak inhibice Rac signalizace v buňkách vykazujících oba způsoby invazivity (fibrosarkomové buňky HT1080, melanomové buňky A375P) nevede ke ztrátě migrační schopnosti a dochází k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Sanz-Moreno *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2009).

Na regulaci mezenchymálního způsobu invazivity se podílí kromě samotného proteinu Rac i regulační proteiny Rac GTPázy. Patří mezi ně DOCK3, což je GEF (guanine nucleotide exchange factor) protein Rac GTPázy, a protein NEDD9, což je adaptorový protein tvořící komplex s DOCK3 (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). Inaktivace obou těchto proteinů eliminuje zastoupení protáhlých buněk A375M2 a navozuje téměř kompletní zastoupení buněk kulaté morfologie (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). Rac1 reguluje tvorbu fokálních adhezí a stresových vláken nezbytných pro mezenchymální invazivitu (Guo *et al.*, 2006). Kromě toho Rac1, DOCK3 a NEDD9 ovlivňují míru fosforylace lehkého řetězce myosinu (MLC) a aktomyosinovou kontraktilitu pomocí proteinu WAVE2 (obr.7). Tento protein negativně ovlivňuje fosforylaci MLC a tím inhibuje kulatou morfologii buněk a améboidní migraci (Sanz-Moreno *et al.*, 2008).

Rac GTPáza reguluje tvorbu pseudopodií prostřednictvím proteinového komplexu WAVE2/Arp2/3. Deplece proteinu WAVE2 a deplece Arp3 vede u HT1080 buněk v 3D prostředí k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Yamazaki *et al.*, 2009).



Obr. 7. Regulace améboidní a mezenchymální migrace proteiny, které hrají úlohu v přechodech jednotlivých typů invazivit, viz text. (převzato a upraveno ze Sanz-Moreno a Marshall, 2009)

1.4.5. Rho/ROCK signalizace

Rho/ROCK signalizace je klíčová pro améboidní invazivitu. Aktivace jak RhoA tak i ROCK vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu invazivity u nádorových buněk (Sahai a Marshall, 2003). Během migrace buňky musí být Rho/ROCK signalizace regulována. V posledních letech bylo objeveno několik proteinů, které tuto regulaci zajišťují.

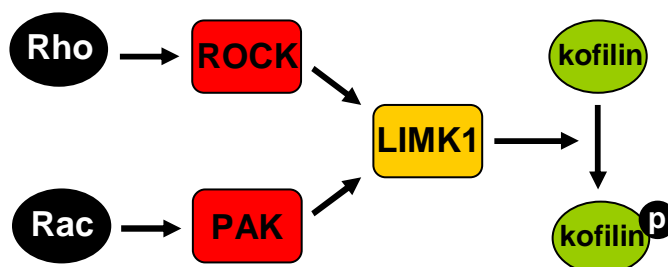
Protein p53 je transkripční faktor, který působí jako tumor supresorový protein. p53 ovlivňuje buněčnou polaritu a buněčnou migraci tím, že negativně reguluje Rho GTPázy. V myších embryonálních fibroblastech p53 inhibuje tvorbu filopodií regulovanou Cdc42 GTPázou (Gadea *et al.*, 2002). Protein p53 je důležitý pro mezenchymální invazivitu, ztráta funkce p53 vede v 3D prostředí k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Gadea *et al.*, 2007). p53 reguluje distribuci β 1-integrinu a ezrinu (Gadea *et al.*, 2007), tyto proteiny se podílejí na polarizaci buňky (Sahai a Marshall, 2003). Inhibice p53 vede k akumulaci RhoA do blebů (Gadea *et al.*, 2007). Jedním z možných cílů p53 v regulaci morfologie a invazivity buněk by mohl být RhoE (Gadea *et al.*, 2007). RhoE je transkripčním cílem p53 při genotoxickém stresu. RhoE je člen Rho rodiny, který se váže na kinázu ROCK a na rozdíl od RhoA a RhoC blokuje její kinázovou aktivitu na plazmatické membráně (Riento *et al.*, 2003).

Další protein, jehož inhibice způsobuje mezenchymálně-améboidní přechod je Smurf1 (Sahai *et al.*, 2007). Smurf1 je E3 ubiquitin ligáza, která na vedoucím konci buňky degraduje RhoA (Wang *et al.*, 2006). Degradace RhoA je spojena s poklesem aktivity kinázy ROCK a se snížením fosforylace MLC. Tato lokální inhibice kontraktility prostřednictvím Smurf1 je podmínkou pro mezenchymální způsob invazivity nádorových buněk. Inhibice Smurf1 vede k tvorbě blebů a akumulaci RhoA do těchto struktur. Dále ke kortikální lokalizaci aktinu, periferní lokalizaci ROCK a zvýšení hladiny fosforylovaného MLC. Inhibice Smurf1 u BE buněk je dostatečnou podmínkou pro mezenchymálně-améboidní přechod (Sahai *et al.*, 2007). Smurf1 zajišťuje lokální inaktivaci RhoA na vedoucím okraji buňky, důležitou pro Rac závislou tvorbu lamelipodií. Intracelulární aktivita RhoA/ROCK/MLC2 důležitá pro kontrakci buněčného těla není Smurf1 proteinem ovlivněna (Sahai *et al.*, 2007).

EphA2 je receptorová tyrosin kináza důležitá v embryonálním vývoji, buněčné migraci a invazivně nádorových buněk (Kullander a Klein, 2002; Dodelet a Pasquale, 2000). Zvýšená hladina kinázy EphA2 je přítomna v agresivních melanomových

buňkách (Kinch a Carles-Kinch, 2003). Reexprese a aktivace EphA2 ve slabě metastatických melanomových F10-M3 buňkách vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu a ke zvýšení invazivity těchto nádorových buněk (Parri *et al.*, 2009). Aktivace EphA2 vede u melanomových buněk k aktivaci RhoA signalizace (Parri *et al.*, 2007; 2009) a inhibici Rac1 signalizace (Parri *et al.*, 2009). Aktivace kinázy EphA2 vede též k inhibici integrinové signalizace (Miao *et al.*, 2000). EphA2 aktivuje Src-FAK komplex a tato aktivace je spojena s aktivací aktomyosinové kontrakce závislé na RhoA signalizaci (Parri *et al.*, 2007; 2009), přesný mechanismus fungování není známý.

LIM kináza1 (LIMK1) je důležitá pro mezenchymálně-améboidní přechod u HT1080 buněčné linie (Mishima *et al.*, 2010). LIMK1 fosoryluje kofilin na serinu 3 a tím inaktivuje jeho F-aktin degradační funkci (Yang *et al.*, 1998). LIMK1 je aktivována u HT1080 buněk po působení proteázových inhibitorů a aktivace LIMK1 je inhibována inhibitorem kinázy ROCK (Mishima *et al.*, 2010). Kináza ROCK1 fosoryluje a tím aktivuje LIMK1 (Maekawa *et al.*, 1999). LIMK1 je důležitá pro mezenchymální i pro améboidní migraci (obr. 8). V améboidně se pohybujících se buňkách pravděpodobně stabilizuje aktomyosinovou strukturu blebů pomocí fosorylace kofilinu (Mishima *et al.*, 2010). V mezenchymálně se pohybujících se buňkách LIMK1 reguluje tvorbu lamelipodií v závislosti na aktivaci Rac (Nishita *et al.*, 2005).



Obr.8. Schéma aktivace kinázy LIMK a následné inhibice kofilinu.

V buňkách rakoviny prsu MDA-MB231 byla pozorována přímá interakce ROCK1 s LIMK2 (Shea *et al.*, 2008). V těchto buňkách komplex kináz nereguluje améboidní způsob migrace (Shea *et al.*, 2008), interakce těchto dvou kináz je důležitá pro mezenchymální způsob migrace. Inhibují aktivitu kofilinu a přispívají tím ke stabilizaci aktomyosinových vláken (Shea *et al.*, 2008).

1.4.6. Mikrotubuly

Dynamika mikrotubulů je důležitá pro adhezi, migraci a morfologii buněk. Dynamika mikrotubulů je přísně regulována, mezi důležité regulátory patří stabilizační a destabilizační proteiny. Stathmin1 (neboli Onkoprotein18) patří do skupiny destabilizačních proteinů (Curmi *et al.*, 1999), v mnoha typech nádorů je hladina stathminů zvýšena (Curmi *et al.*, 2000). Stathmin1 stimuluje buněčnou motilitu *in vitro* a zvyšuje metastatický potenciál (Belletti *et al.*, 2008). Stathmin je negativně regulován fosforylací (Curmi *et al.*, 1999). Po interakci buňky s ECM je stathmin nafosforylován (Belletti *et al.*, 2008) a dojde tak ke stabilizaci mikrotubulů (Palazzo *et al.*, 2004). Nefosforylovatelná mutanta narušuje stabilizaci mikrotubulů, zvyšuje invazivní potenciál buněk a indukuje mezenchymálně-améboidní přechod (Belletti *et al.*, 2008). Destabilizace mikrotubulů u neutrofilů vede k aktivaci kinázy ROCK a ke zvýšení hladiny fosforylovaného MLC (Niggli, 2003). U migrujících buněk nebyla zatím pozorována zvýšená hladina fosforylovaného MLC a aktivita kinázy ROCK v souvislosti s destabilizačním účinkem stathminu.

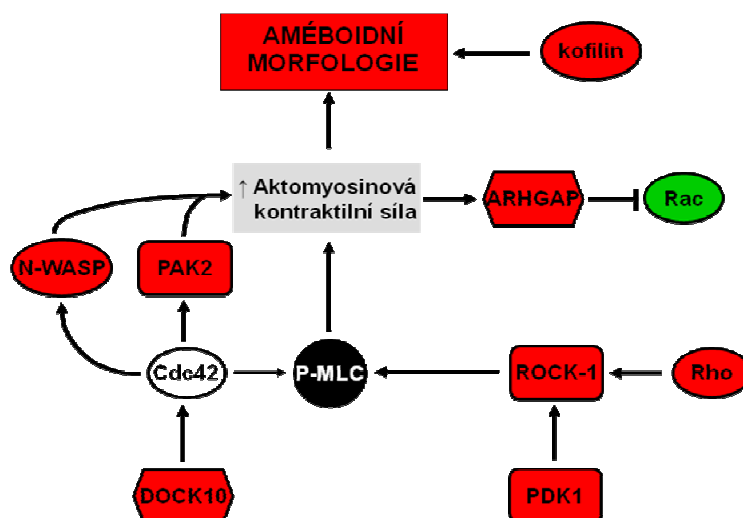
Tumor supresorový protein p27 je inhibitor cyklin dependentních kináz (CDK), kromě kontroly buněčného cyklu reguluje buněčnou migraci. Protein p27 reguluje stabilitu mikrotubulů a následně adhezi buněk k extracelulární matrix. Stabilita mikrotubulů je zajištěna vazbou p27 na stathmin a jeho inaktivací (Baldassarre *et al.*, 2005). Role p27 v migraci buněk je stále kontroverzním tématem, může vést k aktivaci i inhibici motility buněk (shrnutí v Berton *et al.*, 2009). Src transformované fibroblasty mají v 3D kolagenu stejné zastoupení kulatých i protáhlých buněk. Delece p27 vede ke značnému navýšení buněk kulaté morfologie. Změna morfologie je doprovázena změnou lokalizace mikrotubulů z pseudopodií do perinukleární oblasti, tvorbou kortikální aktinové sítě a ztrátou klastrové lokalizace β 1-integrinů (Berton *et al.*, 2009). Ztráta p27 vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu. Pro mezenchymální invazivitu je důležitá C-koncová oblast p27, která zprostředkovává vazbu stathminu, a tím stabilizaci mikrotubulů (Baldassarre *et al.*, 2005). C-koncová část p27 je důležitá pro Rho signalizaci (Berton *et al.*, 2009; Besson *et al.*, 2004), jak přesně reguluje p27 Rho dráhu ještě není zcela zřejmé. Přímá vazba p27 a RhoA byla pozorována pouze při současné overexpresi obou proteinů v 293 buňkách (Besson *et al.*, 2004).

1.4.7. Signalizace prostřednictvím neuropilinu a p130Cas

Neuropilin 1 (NRP1) je receptor pro semaforin (He *et al.*, 1997) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (Soker *et al.*, 1998). Zvýšená exprese neuropilinu 1 byla pozorována u řady nádorových buněk (shrnutí v Bagri *et al.*, 2009). Neuropilin 1 může být posttranslačně modifikován, rovnováha mezi nemodifikovaným a modifikovaným neuropilinem v organismu rozhoduje o invazivním charakteru buněk (Frankel *et al.*, 2008). Pro invazivitu je důležitý serin 612 (Frankel *et al.*, 2008), který je za fyziologického stavu modifikován chondroitin sulfátem (Shintani *et al.*, 2006). Mutace serinu 612 neuropilinu 1 v gliomových buňkách U87MG vede ke ztrátě modifikovatelnosti tohoto proteinu (Frankel *et al.*, 2008). Tato mutace vede ke zvýšení invazivity gliomových buněk a ke zvýšení hladiny fosforylovaného p130Cas. Inhibice p130Cas v těchto mutantech vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Frankel *et al.*, 2008). Data naznačují, že neuropilin1 a p130Cas regulují mezenchymální invazivitu některých nádorových buněk.

1.5. Améboidně-mezenchymální přechod (AMT)

Klíčovou signalizací améboidní invazivity je Rho/ROCK dráha, která vede k aktomyosinové kontrakci. Na obr.9 jsou znázorněny proteiny jejichž inhibice vede k améboidně-mezenchymálnímu přechodu. Améboidně-mezenchymální přechod invazivity nádorových buněk je na rozdíl od mezenchymálně-améboidního přechodu méně prostudován. Tento fakt je jedním z důvodů, proč jsme se rozhodli studovat améboidně-mezenchymální přechod invazivity u melanomových buněk A375M2.



Obr.9. *Proteiny zodpovědné za améboidně-mezenchymální přechod.* (převzato a upraveno z Paňková et al., 2010) Inhibice červeně označených proteinů vede v 3D prostředí k améboidně-mezenchymálnímu přechodu invazivity nádorových buněk. Aktivace zeleně označeného Rac vede v 2D prostředí k améboidně-mezenchymálnímu přechodu.

1.5.1. Rho signalizace

Améboidní invazivita je závislá na Rho/ROCK signalizaci, která vede k aktomyosinové kontrakci. Prvním popsaným mechanismem vedoucím k améboidně-mezenchymálnímu přechodu byla právě inhibice této dráhy (Sahai a Marshall, 2003). Inhibice jak Rho GTPázy, tak i kinázy ROCK vede u améboidně invadujících melanomových buněk A375M2 k přechodu na mezenchymální způsob invazivity (Sahai a Marshall, 2003).

Kortikální aktomyosinová kontrakce je podmíněna aktivitou a správnou lokalizací kinázy ROCK1. Lokalizace ROCK1 do plazmatické membrány je kromě RhoA-GTP zajišťována i kinázou PDK1 (Pinner a Sahai, 2008). PDK1 se váže na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfáty plazmatické membrány. Lokalizace ROCK1 do plazmatické membrány je zprostředkována interakcí s PDK1. Tato lokalizace kinázy ROCK1 není závislá na kinázové aktivitě PDK1 (Pinner a Sahai, 2008). PDK1 soutěží o vazebné místo kinázy ROCK1 s RhoE (Rnd3) proteinem, který brání lokalizaci ROCK1 do plazmatické membrány. Snížení exprese PDK1 u buněk vykazující améboidní invazivitu (A375M2, MTLn3 a BE buněk) vede ke snížení aktomyosinové kontraktility a vede k mezenchymálnímu charakteru buněk (Pinner a Sahai, 2008).

Interakce ROCK1 s RhoA-GTP není dostatečná pro lokalizaci do plazmatické membrány (Pinner a Sahai, 2008).

1.5.2. Rac signalizace

Rac1 signalizace je důležitá pro mezenchymální způsob invazivity. Exprese konstitutivně aktivní Rac GTPázy (Rac1 Q61L) u melanomových buněk A375M2 vede ke značnému nárůstu buněk protáhlé morfologie na 2D tlusté vrstvě kolagenu (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). V 3D prostředí však tato změna morfologie doposud nebyla pozorována.

Rho/ROCK signalizace aktivuje améboidní migraci u A375M2 buněk mimo jiné inhibicí mezenchymální migrace. Rho/ROCK signalizace aktivuje GAP protein ARHGAP22, který inhibuje Rac GTPázu (Sanz-Moreno *et al.*, 2008) (obr.7). Inhibice exprese ARHGAP22 vede ke snížení hladiny fosforylovaného MLC a ke zvýšení zastoupení buněk mezenchymální morfologie (Sanz-Moreno *et al.*, 2008).

1.5.3. Cdc42 signalizace

Améboidní invazivita je u melanomových buněk A375M2 regulována kromě Rho/ROCK dráhy ještě Cdc42 signalizací (Gadea *et al.*, 2008). GEF protein Cdc42 GTPázy DOCK10, je klíčový regulátor améboidní migrace (obr.7). Inhibice DOCK10 vede ke snížení hladiny fosforylovaného MLC, zvýšení aktivity Rac1 a s tím souvisejícímu améboidně-mezenchymálnímu přechodu (Gadea *et al.*, 2008). N-WASP a PAK2 jsou efektorové proteiny Cdc42, které jsou také důležité pro améboidní morfologii (obr.7). Snížení hladiny exprese N-WASP i PAK2 vede ke zvýšení počtu protáhlých buněk, ale pouze inhibice PAK2 vede ke snížení fosforylace MLC (Gadea *et al.*, 2008). Inhibice Cdc42 u A375M2 buněk vede k inhibici migrace, ale nedochází k améboidně-mezenchymálnímu přechodu. Cdc42 je důležitý jak pro améboidní, tak i mezenchymální invazivitu (Gadea *et al.*, 2008).

1.5.4. Kofilin

Kofilin je regulační protein aktinového cytoskeletu. Různé metastatické buňky se liší hladinou exprese a regulací tohoto proteinu. Kofilin je inhibován fosforylací na serinu 3 kinázou LIMK a TESH (Okano *et al.*, 1995; Toshima *et al.*, 2001). Snížení hladiny exprese kofilinu u MTLn3 metastatických buněk vede k mezenchymální morfologii (Sidani *et al.*, 2007). Snížení aktivity kofilinu koreluje se snížením metastatického potenciálu buněk (Mouneimne *et al.*, 2006; Sidani *et al.*, 2007).

2. Materiál a metody

2.1. Materiál

2.1.1. Modelový organismus

A375M2- savčí melanomové buňky s vysokým metastatickým potenciálem

2.1.2. Roztoky pro kultivaci savčích buněk

Kompletní médium DMEM

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Invitrogen)

10% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma)

1% neesenciální aminokyseliny (MEM NEAA) (Gibco, Invitrogen)

1% obecná antibiotika - antimykotika (ATB) (Gibco, Invitrogen)

Obecná antibiotika - antimykotika (ATB) (Gibco, Invitrogen) obsahují:

10 µg/ml penicilin; 10 µg/ml streptomycin; 25 µg/ml amphotericin

Další roztoky

25% trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen) 2,5 g/l trypsin 0,38 g/l kyselina

etylendiamintetraoctová (EDTA)

10 x PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄.12 H₂O; 1,4 mM

KH₂PO₄, pH upraveno na 7,3

Zamrazovací roztok

10% DMSO (dimetylsulfoxid) (Sigma); 90% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma)

Inhibitory

Y27632- inhibitor kinázy ROCK, 10 µM (Sigma)

PD 98059- inhibitor kinázy MEK1 (MAPKK), 10 µM (LC Laboratories)

LiCl- inhibitor kinázy GSK3β, 3 mM

Gö6976- inhibitor kinázy PKCα, 1 µM, (Sigma)

2.1.3. Roztoky pro přípravu proteinových lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE

RIPA pufr

0,15 M NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% Nodinet P – 40; 0,1% SDS;
1% deoxycholát sodný; 5 mM EDTA; 50 mM NaF

Zásobní roztok fosfatázových inhibitorů (100x)

Phosphatase Inhibitor Mix II (Serva, Germany)

Zásobní roztok proteázových inhibitorů (100x)

12,5 mg/ml pefabloc; 0,5 mg/ml leupeptin; 0,5 mg/ml aprotinin

Vzorkový pufr

6x Laemmli pufr 0,39 M Tris-HCl, pH 6,8; 12% SDS; 50% glycerol; 0,012%
bromfenolová modř

2.1.4. Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

Složky polyakrylamidového gelu

Protogel 30% akrylamid; 0,8% N,N'-methylenbisakrylamid; přefiltrováno přes filtr
s póry 0,45 mm, skladováno v temnu při 4°C

4x Tris/SDS pH 8,8; 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% SDS; přefiltrováno přes filtr s póry
0,45 mm, skladováno v temnu při 4°C

4x Tris/SDS pH 6,8; 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS; přefiltrováno přes filtr s póry
0,45 mm, skladováno v temnu při 4°C

SDS-PAGE pufr (1x SDS)

25 mM Tris (pH 8,3); 190 mM glycine; 0,1% SDS

Barvicí roztok

20% metanol; 10% kyselina octová; 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad,
USA)

Odbarvovací roztok

5% metanol; 7% kyselina octová

Transferový pufr

25 mM Tris; 192 mM glycine; 20% metanol; 0,05% SDS

TBS

20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl

TTBS

0,05% Tween 20 (Serva) v TBS

Blokovací roztok

4% BSA (Milipore) v TBS

Roztok pro naředění primární a sekundární protilátky

1% BSA (Milipore) v TTBS

Vyvíjecí roztok

SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Biotechnology)

souprava obsahuje: roztok luminolu s enhancerem a roztok stabilního peroxidu

vyvíjecí roztok pro křenovou peroxidázu připravíme smícháním roztoků z příslušné soupravy v poměru 1:1

Stripovací pufr (100ml)

4,7 μ l 2-merkaptoetanol (14,7 M) (Sigma); 20 ml 10% SDS; 3,9 ml 1M TrisHCl pH 6,8 (3,9 ml 4x SDS pH 6,8); doplnit do 100 ml deionizovanou vodou

2.1.5. Seznam primárních protilátek

p-kofilin (Ser3), 1:1000, 19 kDa, rabbit, monoklonální, Cell Signaling

β -katenin, 1:1000, 92 kDa, mouse, monoklonální, BD Transduction Laboratories

MT1-MMP, 1:500, 66 kDa, goat, polyklonální, Santa Cruz Biotechnology

p-PKC α (Ser657), 1:500, 80 kDa, goat, polyklonální, Santa Cruz Biotechnology

MMP2, 1:500, 72 kDa, 63 kDa, rabbit, polyklonální, Santa Cruz Biotechnology

uPa, 1:500, 55 kDa, 33 kDa, rabbit, polyklonální, Santa Cruz Biotechnology

2.1.6. Seznam sekundárních protilátek

Goat anti-mouse IgG-HRP, 1:5000

Donkey anti-goat IgG-HRP, 1:5000

Goat anti-rabbit IgG-HRP, 1:5000

Proteinový marker: Fermantas SM0671

2.1.7. Složky pro přípravu kolagenových a matrigelových maticí

Kolagen R (Kolagen typu I, Serva), 4 mg/ml

0,25 M NaHCO₃: 2,2 g NaHCO₃ v 100 ml 1x CMF-HBSS

1x CMF-HBSS: 900 ml destilované vody; 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,06 g KH₂PO₄;

0,35 g NaHCO₃; 0,112 g Na₂HPO₄·12H₂O; pH 7,4 (pomocí 2 M NaOH)

Bovinní fetální sérum (FBS) (Sigma)

10x PBS (Invitrogen)

10x H-MEMd

BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix, Phenol Red Free; 9,5 mg/ml (BD Biosciences)

BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free; 7,8 mg/ml (BD Bioscience)

BD Cell Recovery Solution (BD Bioscience)

24-jamková destička (Iwaki)

96-jamková destička (Iwaki)

6-jamková destička (Iwaki)

2.1.8. Složky pro přípravu želatinem pokrytých sklíček a jejich fixaci

Želatin 10 mg/ml v 0,1 M NaHCO₃

0,1 M NaHCO₃

Fluorescenční značku AlexaFluor 633 (Invitrogen)

Dimetylformamid (Sigma)

0,5% Glutaraldehyd v PBS (Sigma)

4% paraformaldehyd v PBS (Sigma)

Faloidin AlexaFluor 488 (Invitrogen)

Montovací médium

6 g glycerolu; 2,4 g mowiol; 6 ml vody; 12 ml pufru (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 8,3)

DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]octan) (Sigma)

2.1.9. Roztoky pro přípravu zymografie

5 mg/ml želatinu (BioRad) ve vodě

Renaturační pufr

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 2,5% Triton X-100

Aktivační pufr

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 0,02% NaAzid

2.2. Metody

2.2.1. Pasážování buněk

Savčí buňky jsou kultivovány v 37°C a 5% CO₂ na miskách pro tkáňové kultury o průměru 60 nebo 100 mm. Na malé misce (průměr 60 mm) kultivujeme buňky v 4 ml média, na velké misce (průměr 100 mm) v 10 ml. V závislosti na konfluenciisky provádíme pasážování buněk po 2-4 dnech. Konfluenci a případné kontaminace pravidelně kontrolujeme pod mikroskopem (Nikon Eclipse TS 100).

Před pasážováním je třeba nechat vytemperovat média a trypsin ve vodní lázni při 37°C po dobu 15 minut.

Z misky odsajeme médium a přidáme trypsin (na malou misku 0,5 ml; na velkou misku 1 ml) a celý povrch opláchneme krouživým pohybem. Trypsin odsajeme a nahradíme novým trypsinem ve stejném objemu.

Trypsin necháme působit 3-5 minut v termostatu, dokud se buňky neoddělí ode dna misky.

Přidáme kompletní médium DMEM, tím zablokujeme aktivitu trypsinu a agregáty buněk resuspendujeme.

Na novou misku přeneseme požadované množství buněčné suspenze a doplníme kompletním médiem DMEM.

2.2.2. Příprava stabilátů savčích buněk

Stabiláty připravujeme z velké misky (průměr 100 mm) po dosažení 100% konfluence. Z misky odsajeme médium, opláchneme misku 1 ml trypsinu a opět odsajeme.

Na misku přidáme znovu stejný objem trypsinu a necháme působit v termostatu po dobu 3-5 minut.

Přidáme 4-10 ml kompletního média a resuspendujeme. Buněčnou suspenzi přeneseme do 15 ml plastové zkumavky Falcon a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 2-3 min, 21-23°C).

Opatrně odsajeme médium, buněčný sediment resuspendujeme v 1 až 2 ml zamrazovacího roztoku a rozplníme do zamrazovacích mikrozkuvek. Mikrozkuvky umístíme do nádoby s isopropanolem, uložíme do -70°C a druhý den mikrozkuvky přeneseme do kontejneru s tekutým dusíkem.

2.2.3. Rozpěstování stabilátů savčích buněk

Mikrozkuvku vyjmeme z kontejneru s tekutým dusíkem a přeneseme na led.

Ve vodní lázni při 37°C necháme buněčnou suspenzi co nejrychleji roztát a poté ji přeneseme do připravené 15 ml plastové zkumavky Falcon s 5-10 ml vytemperovaného média.

Buněčnou suspenzi v médiu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min, 21-23°C) a supernatant opatrně odsajeme.

Buněčný sediment resuspendujeme v 5-10 ml vytemperovaného kompletního média a opět centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min, 21-23°C).

Supernatant opět opatrně odsajeme, buněčný sediment resuspendujeme v 5 ml čerstvého kompletního média a přeneseme na velkou misku. Přidáme dalších 5 ml kompletního média a kultivační misku umístíme do termostatu.

2.2.4. Příprava proteinových lyzátů z tkáňových kultur

Lyzáty ze savčích buněk připravujeme nesterilně na led. Velkou případně malou misku s narostlými buňkami přeneseme z termostatu na led.

Nesterilně odsajeme médium a misku dvakrát opláchneme 1x PBS, velkou misku cca 5 ml, malou misku cca 3 ml.

Na velkou misku přidáme 1 ml, na malou misku 300-400 µl vychlazené směsi lyzačního pufru RIPA, proteázových inhibitorů (1:100) a fosfatázových inhibitorů (1:100).

Necháme lyzovat 12-15 minut při 4°C na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1).

Po lýzi buněk buňky seškrábneme z povrchu misky škrabkou na buňky, převedeme do mikrozkuhavky a 6x protáhneme obsah injekční stříkačkou s jehlou 21G dokud není suspenze čirá.

Lyzáty zamrazíme v -20°C, nebo připravíme vzorky pro SDS-PAGE.

Standardně po protáhnutí lyzátu injekční stříkačkou suspenzi centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000 g, 20 min, 0°C).

Po centrifugaci odsajeme opatrně supernatant a převedeme do nové mikrozkuhavky.

Odebereme aliquot 50 µl pro stanovení proteinové koncentrace.

Lyzáty zamrazíme v -20°C, nebo připravíme vzorky pro SDS-PAGE.

2.2.5. Stanovení proteinové koncentrace Folinovou metodou

Proteinovou koncentraci savčích lyzátů stanovujeme kolorimetricky pomocí soupravy Dc Protein Assay (Bio-Rad, USA).

Připravíme si ředící řadu hovězího sérového albuminu (BSA) dle následujícího tabulky:

BSA 2 mg/ml (µl)	Lyzační pufr RIPA	finální koncentrace (µg/µl)
0	40	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1500

Tab.2. Ředící řada hovězího sérového albuminu

Připravíme si roztok A' přidáním 20 µl roztoku S do roztoku A.

Z odebraného aliquotu lyzátu přeneseme 25 µl do nové mikrozkuhavky a přidáme 25 µl lyzačního pufru RIPA.

Do nových mikrozkuhovek pipetujeme 25 µl lyzátu s RIPA pufrům z předchozího kroku nebo 25 µl standardu BSA.

Dále do každé z mikrozkuhovek z předchozího kroku pipetujeme 125 µl roztok A'.

Dále do každé mikrozkuhavky přidáme 1 ml roztoku B, krátce vortexujeme a necháme 15 minut ve tmě.

Po 15 minutách inkubace změříme absorbanci vzorků při 750 nm. Ze získaných dat vytvoříme graf závislosti absorbance na proteinové koncentraci. Dopočítáme

proteinovou koncentraci vzorků a upravíme ji na srovnatelnou hodnotu pomocí ředění pufrům RIPA.

2.2.6. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Přidáme 1/4 objemu 6x Laemmliho pufru a 1/20 objemu 1 M dithiotreitolu (DTT) k buněčnému lyzátu.

Povaříme cca 10 minut v bločku při 100°C. Vzorky zamrazíme nebo nanese na SDS-PAGE.

2.2.7. Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)

Směs pro jeden gel silný 0,75 mm smícháme v následujícím pořadí:						
	Separační gel				Zaostřovací gel	
	7,5%	10%	12%	15%		
deionizovaná voda	2,50 ml	2,08 ml	1,75 ml	1,25 ml	deionizovaná voda	1,550 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	4x Tris/SDS pH 6,8	0,625 ml
protogel 30% AA/0,8% Bis	1,25 ml	1,67 ml	2,00 ml	2,50 ml	protogel 30% AA/0,8% Bis	0,325 ml
TEMED	3,4 µl	3,4 µl	3,4 µl	3,4 µl	TEMED	2,5 µl
10% APS	16,5 µl	16,5 µl	16,5 µl	16,5 µl	10% APS	12,5 µl

Tab.3. Rozpis roztoků pro přípravu separačního a zaostřovacího polyakrylamidového gelu

Po sestavení aparatury pro nalévání gelů (BIO-RAD Mini Protean III Cell) smícháme složky pro separační gel (viz. tab.3) a ihned nalijeme do prostoru mezi skly v aparatuře. Překryjeme vrstvou deionizované vody, abychom zabránili přístupu vzduchu, který brání polymeraci gelu.

Po zpolymerování gelu (cca 10-20 min) odstraníme deionizovanou vodu a převrstvíme separační gel čerstvě namíchanou směsí pro zaostřovací gel.

Mezi skla vložíme hřeben na vytvoření jamek pro nanášení vzorků.

Po polymeraci zaostřovacího gelu hřebínek opatrně vytáhneme, abychom nepoškodili vytvořené jamky. Jamky několikrát propláchneme 1x SDS.

Roztoky proteinů ve vzorkovém pufru inkubujeme 5 minut při 100°C a po odstranění případných pevných součástí centrifugací (10 000 g /0,5 min) nanese do jamek v gelu pomocí mikrostříkačky (Hamilton).

Dvojici gelů (nebo jeden gel a plastový nástavec) vložíme do aparatury pro elektroforézu (BIO-RAD Mini Protean III Cell) a zalijeme 1x SDS.

Elektroforetické dělení v zaostřovacím gelu probíhá při konstantním proudu 10 mA/gel. Když se bromfenolová modř ze vzorkového pufru (a spolu s ní tzv. čelo elektroforézy) dostane na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, změníme protékající proud na 20 mA/gel.

Když čelo elektroforézy dosáhne spodního okraje gelu, odpojíme zdroj elektrického napětí a gel vyjmeme z aparatury. Odstraníme zaostřovací část gelu.

Gel lze barvit barvicím roztokem, nebo jej použít pro přenos proteinů na membránu metodou Western blot.

2.2.8. Western blot

Pro přenos proteinů na membránu použijeme aparaturu BIORAD Trans-blot.

Z gelu s rozdělenými proteiny pomocí SDS-PAGE odstraníme zaostřovací část gelu. Sestavíme blotovací sendvič pro přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu (Nitrobind, MSI, USA) v následujícím pořadí: izolační houbička, filtrační papír Whatman, gel, nitrocelulózová membrána (navlhčená v transferovém pufru), filtrační papír Whatman, izolační houbička.

Blotovací sendvič umístíme do aparatury a doplníme transferovým pufrem.

Přenos necháme probíhat při napětí 95-110 V (podle velikosti požadovaných proteinů) za stálého míchání a chlazení ledem po dobu 1-2 hodiny.

Membránu s přenesenými proteiny opláchneme v TBS a provedeme imunodetekci proteinů.

Gel po blotování barvíme 30 min v barvicím roztoku, pro kontrolu přenosu proteinů. Poté gel necháme odbarvovat v odbarvovacím roztoku do druhého dne na třepačce.

2.2.9. Imunodetekce proteinů na membráně

Membránu s přenesenými proteiny po Western blotu opláchneme roztokem TBS.

Blokujeme 1 hodinu v blokovacím roztoku (4% BSA v TBS) na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1) v termostatu při 37°C.

Membránu zatavíme do polyetylenové fólie a inkubujeme s roztokem primární protilátky (1% BSA v TTBS) přes noc na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1) v lednici při 4°C.

Následující den odmyjeme přebytečnou primární protilátku roztokem TTBS 5x po 5-10 minutách. Roztok sekundární protilátky (1% BSA v TTBS) konjugované s křenovou peroxidázou (HPR) přidáme k membráně zatavené do polyetylenové fólie a inkubujeme 1 hodinu.

Poté přebytečnou sekundární protilátku odmyjeme 3x 5-10 min v TTBS a 1x 5 min v TBS. Po odmytí membránu vložíme do průhledné kancelářské fólie očištěné etanolem.

Na membránu nanese vyvíjecí roztok pro křenovou peroxidázu. Musíme dávat pozor, aby membrána nevyschla.

Signál detekujeme pomocí vyvolávacího přístroje LAS-4000. Necháme exponovat požadovanou dobu dle množství detekovaného proteinu a kvality protilátek.

2.2.10. Stripování membrány western blotů

stripovací pufr (100 ml)

4,7 μ l 2-merkaptoetanol (14,7 M)

20 ml 10% SDS

3,9 ml 1 M TrisHCl pH 6,8 (3,9 ml 4x SDS pH 6,8)

doplnit do 100 ml deionizovanou vodou

Po detekci signálu pomocí LAS4000 inkubujeme nitrocelulózovou membránu ve stripovacím pufru 30 minut při 50°C ve tmě na třepačce.

Membránu třikrát promyjeme po 10 minutách v TTBS. Membránu dáme do blokovacího roztoku (4% BSA v TBS) a necháme blokovat 60 minut v termostatu při 37°C.

Dále s membránou pracujeme podle normálního protokolu pro imunodetekci proteinů.

2.2.11. Příprava kolagenu pro pozorování v 3D prostředí

0,2% roztok kolagenu

24-jamková destička

1 jamka- 500 µl roztoku kolagenu:

52 µl H-MEMd (10x)

156 µl 1x PBS

26 µl FBS

26 µl 0,25 M NaHCO₃

261 µl kolagenu typu I

96-jamková destička

1 jamka- 80 µl roztoku kolagenu:

8,3 µl H-MEMd (10x)

25 µl 1x PBS

4,2 µl FBS

4,2 µl 0,25 M NaHCO₃

42 µl kolagenu typu I

Buňky pasážujeme, po centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min, 21-23°C) sediment buněk resuspendujeme v kompletním médiu. Buňky spočítáme v počítací komůrce.

Na ledu si připravíme roztok 0,2% kolagenu dle rozpisu.

Přidáme buňky a pečlivě promícháme pomocí pipety, aby se netvořily bubliny. Pro jamky 24-jamkové destičky smícháme $7 \cdot 10^4$ až $1 \cdot 10^5$ buněk s 500 µl roztoku kolagenu. Pro jamky 96-jamkové destičky smícháme $1,1 \cdot 10^4$ buněk s 80 µl roztoku kolagenu. Objem buněk nahradíme místo daného objemu 1x PBS.

Roztok kolagenu s buňkami napipetujeme do jamek destičky. 500 µl kolagenového roztoku na jednu jamku 24-jamkové destičky, 80 µl kolagenového roztoku na jednu jamku 96-jamkové destičky.

Jamkovou destičku s kolagenem vložíme na 45-60 minut do termostatu kvůli ztuhnutí kolagenu.

Po ztuhnutí kolagenu jamku 24-jamkové destičky velmi opatrně převrstvíme 1 ml kompletního média. Jamku 96-jamkové destičky převrstvíme 150 µl kompletního média.

Inhibitory přidáváme jednak do kolagenové matrice, a jednak do kompletního média jímž převrstvujeme.

Buňky necháme v termostatu nejméně 24 hodin. Poté buňky manuálně počítáme na mikroskopu (Nikon Eclipse TS 100) pomocí programu NIS element. Fotografie buněk jsme pořizovali pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu (MC2).

2.2.12. Příprava matrigelu pro pozorování buněk v 3D prostředí a pro přípravu proteinových lyzátů z 3D prostředí

24-jamková destička

1 jamka- 500 μ l roztoku matrigelu:
420 μ l Matrigelu s růstovými faktory
19 μ l FBS
37 μ l buněk v DMEM ($1,25 \cdot 10^5$)
25 μ l DMEM/ Y27632 (50 μ M)

96-jamková destička

1 jamka- 80 μ l roztoku matrigelu:
67 μ l Matrigelu s růstovými faktory
3 μ l FBS
6,1 μ l buněk ($1,1 \cdot 10^4$)
4 μ l DMEM/ Y27632 (50 μ M)

Matrigel necháme roztát na ledu. Poté smícháme FBS, buňky v DMEM, Y27632 a tuto směs necháme 10 minut na ledě. Pro jamku 24-jamkové destičky použijeme $1,25 \cdot 10^5$ buněk na 500 μ l směsi matrigelu, pro jamku 96-jamkové destičky použijeme $1,1 \cdot 10^4$ buněk na 80 μ l směsi matrigelu.

Po deseti minutách přidáme matrigel, pečlivě směs promícháme pomocí pipety a napipetujeme tuto matrigelovou směs na jamkovou destičku.

Jamkovou destičku s matrigelem vložíme na 45-60 minut do termostatu kvůli ztuhnutí matrigelu. Po ztuhnutí velmi opatrně převrstvíme 1 ml/150 μ l kompletního média, nebo 1 ml/150 μ l kompletního média s inhibitory.

Buňky necháme v termostatu 24 hodin. Poté pozorujeme na mikroskopu (Nikon Eclipse TS 2000) morfologii buněk, nebo tyto matrigelové matrice použijeme pro přípravu proteinových lyzátů buněk z 3D prostředí.

2.2.13. Rozpouštění matrigelové matrice

Celý proces rozpouštění matrigelu provádíme v chladové místnosti při 2-4°C. Předem si necháme vychladit všechny pomůcky a roztoky použité v tomto procesu rozpouštění.

Buňky pěstované 24 hodin v matrigelu na 24-jamkové destičce přeneseme na led, odsajeme médium a třikrát povrch matrigelu opláchneme 1 ml vychlazeným 1x PBS.

Na každou jamku přidáme 500 μ l BD Cell Recovery Solution, který rozpouští matrigel. Pomocí malé špachtle oddělíme matrigel ode dna a od stran jamek 24-jamkové destičky. Pipetou s ustříhlou špičkou přeneseme matrigel s buňkami do předchlazené 15 ml plastové zkumavky Falcon.

Do jamek napipetujeme opět 500 μ l BD Cell Recovery Solution a pomocí stejných špiček z předchozího kroku, přeneseme roztok do stejných 15 ml plastových zkumavek Falcon. Zamezíme tím nechtěným ztrátám buněk. Tento postup přidání 500 μ l BD Cell Recovery Solution opakujeme ještě dvakrát.

Matrigel necháme rozpouštět 30 minut na ledě a poté pomalými pohyby promícháme polorozpuštěnou směs abychom urychlili rozpouštění. Opatrně pohybuje plastovou zkumavkou Falcon dokud se matrigel zcela nerozpustí.

Po rozpuštění tuto směs centrifugujeme v předchlazené centrifuze (Eppendorf Centrifuge 5804R, 250 g, 5 min, 0-2°C).

Velice opatrně odsajeme supernatant a sediment buněk velice jemně resuspendujeme ve 2-3 ml vychlazeného 1xPBS. Po centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5804R, 250 g, 5 min, 0-2°C) opět odsajeme supernatant a sediment buněk opatrně resuspendujeme ve vychlazeném 2 ml DMEM bez FBS (DMEM použijeme místo 1x PBS abychom zamezili ztrátám buněk) a opět centrifugujeme.

Opatrně odsajeme DMEM a k sedimentu buněk přidáme 20 μ l lyzačního pufru RIPA s proteázovými a fosfatázovými inhibitory. Necháme lyzovat 12-15 minut na ledě.

Po lýzi buněk přidáme ke vzorku 7 μ l 6x Laemmli pufru a 0,7 μ l DTT. Vzorky povaříme 10-15 minut.

2.2.14. Příprava buněk pro proteomickou analýzu firmou Kinexus

2D

Připravíme si 2 velké misky (průměr 100 mm) se 100% konfluencí, do jedné misky přidáme 10 μ M inhibitor Y27632, který necháme působit 24 hodin.

Po 24 hodinách z misek odsajeme médium, opláchneme 1 ml trypsinu a opět odsajeme.

Na misku přidáme znovu stejný objem trypsinu a necháme působit v termostatu po dobu 3-5 minut.

Přidáme 5 ml kompletního média DMEM a resuspendujeme. Buněčnou suspenzi přeneseme do 15 ml plastové zkumavky Falcon s 5 ml vytemperovaného kompletního média DMEM a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 2-3 min, 21-23°C).

Opatrně odsajeme médium, buněčný sediment resuspendujeme v 10 ml 1x PBS a buňky centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min, 21-23°C).

Po centrifugaci a odsátí supernatantu sediment buněk resuspendujeme v 1 ml 1x PBS a buňky spočítáme. Odebereme $2 \cdot 10^6$ buněk do mikrozkušavky a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 200 g, 3 min, 21-23°C).

Odsajeme supernatant a mikrozkušavku se sedimentem buněk přeneseme do kontejneru s tekutým dusíkem.

3D - matrigel

Buňky připravíme podle protokolu pro přípravu buněk v matrigelu a buňky získáme dle návodu pro rozpuštění matrigelové matrice.

Připravíme si 2 velké misky (průměr 100 mm). Po působení trypsinu a následné centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min, 21-23°C) v kompletním médiu buňky spočítáme. Připravíme si směs matrigelu a přidáme buňky tak, aby ve třech jamkách 6-jamkové destičky bylo celkem $2,4 \cdot 10^6$ buněk. Takto si připravíme také tři jamky 6-jamkové destičky s 50 μ M inhibitorem Y27632.

Pro přípravu matrigelové směsi na tři jamky 6-jamkové destičky smícháme v 50 ml plastové zkumavce Falcon 732 μ l buněk v kompletním médiu, 360 μ l FBS, 480 μ l kompletního média DMEM a 8040 μ l Matrigelu (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Phenol Red Free).

Pro přípravu matrigelové směsi s 50 μ M inhibitorem Y27632 postupujeme obdobně, jen místo 480 μ l kompletního média DMEM přidáme 480 μ l inhibitoru Y27632. Směs necháme působit 10 minut na ledě a až poté přidáme matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Phenol Red Free).

Na každou jamku 6-jamkové destičky opatrně pipetujeme 3200 μ l matrigelové směsi s buňkami. Po 60 minutách utuhlý matrigel převrstvíme 2 ml kompletního média DMEM +/- 50 μ M inhibitor Y27632.

Po 24 hodinách rozpustíme matrigel dle protokolu. Při poslední centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5417R, 250 g, 5 min, 0-2°C) buňky centrifugujeme v mikrozkušavkách v 1 ml 1x PBS. Odsajeme supernatant a sediment buněk uložíme do kontejneru s tekutým dusíkem.

2.2.15. Příprava sklíček pokrytých želatinem konjugovaným s fluorescenční značkou AlexaFluor633

Rozpustíme 10 mg želatinu v 1 ml 0,1 M hydrogenuhličitanu sodném (NaHCO_3).

Rozpustíme fluorescenční značku AlexaFluor 633 (1 mg) v 100 μl dimethylformamidu.

Do 1 ml roztoku želatinu přidáme 2 μl rozpuštěné fluorescenční značka AlexaFluor633 a necháme v chladové místnosti při 4°C míchat 30 minut na otočné míchače.

Konjugovaný želatin-AlexaFluor633 oddělíme od nekonjugované fluorescenční značky promytím přes kolonu (Zeba Micro Desalt Spin Columns).

Krycí sklíčko sterilizované etanolem pokryjeme 50 μl směsí vody a roztoku želatinu-AlexaFluor633. Tuto směs připravíme přidáním 5 μl roztoku želatinu-AlexaFluor633 do 45 μl vody.

Sklíčko necháme schnout cca 1 hodinu při laboratorní teplotě v laminárním boxu.

Po zaschnutí želatinové směsi přidáme 300 μl vody a 6-jamkovou destičku se sklíčkem umístíme na 15 minut do 4°C.

Odsajeme vodu a přidáme 2 ml 0,5 % roztoku glutaraldehydu v 1x PBS a opět vložíme do 4°C na 30 minut.

Po inkubaci odsajeme roztok glutaraldehydu a 2x opláchneme sterilním 1x PBS. Sklíčka necháme 24 hodin v 1x PBS při 4°C.

Sklíčka opláchneme kompletním médiem DMEM a přidáme buňky.

2.2.16. Fixace sklíček

Sklíčka s narostlými buňkami 3x opláchneme 1x PBS, přidáme 4% paraformaldehyd v 1x PBS a necháme 15 minut fixovat.

Opět 3x opláchneme 1x PBS, na povrch každého sklíčka napipetujeme 200 μl 3% BSA v PBS a inkubujeme 15 minut.

Opatrně odsajeme 3% BSA. Připravíme si faloidin AlexaFluor488 (1 μl faloidinu AlexaFluor488 v 70 μl 3% BSA), na každé sklíčko napipetujeme 70 μl této směsi a inkubujeme 15 minut.

Po dobu 30 minut sklíčka 4x promyjeme v 1x PBS.

Na podložní sklíčko nanese 9 μl montovacího média s DABCO (předem rozpustíme krystalek v montovacím médiu). Sklíčko rychlým pohybem opláchneme v destilované vodě, osušíme a překlopíme do kapky s montovacím médiem.

2.2.17. Zymografie

Buňky trypsinizujeme podle návodu na pasážování savčích buněk. Důkladně odstraníme objem trypsinu dvakrát opakovanou centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 2-3 min, 21-23°C) a resuspendací buněčného peletu v kompletním médiu.

Buňky spočítáme a připravíme si koncentraci $2 \cdot 10^5$ buněk v 500 μ l kompletního média. Toto množství nanese v duplikátech do jamek 24-jamkové destičky.

Po přisednutí buněk vyměníme kompletní médium DMEM za 300 μ l média bez séra (FBS) s 10 μ M koncentrací inhibitoru Y27632.

Po 72 hodinách odebereme 100 μ l média z každé jamky a médium zamrazíme v -70°C.

Vzorky pro polyakrylamidový gel s želatinovým substrátem připravíme smícháním 23 μ l média a 7 μ l 4x Laemmli pufru. K vzorkům nepřidáváme DTT, vzorky ihned nanášíme na PAGE bez předchozího povaření.

Gel s želatinovým substrátem připravíme dle návodu pro přípravu polyakrylamidového gelu. Místo vody přidáváme 5 mg/ml koncentrovaný roztok želatinu ve vodě.

Elektroforetické dělení probíhá při konstantním proudu 15 mA. Elektroforetické dělení musí probíhat při 4°C, proto aparaturu umístíme do ledničky nebo aparaturu obložíme ledem.

Po elektroforetickém rozdělení vzorku gel promýváme v renaturačním pufru po dobu dvou hodin. Každou hodinu renaturační pufr vyměníme za nový.

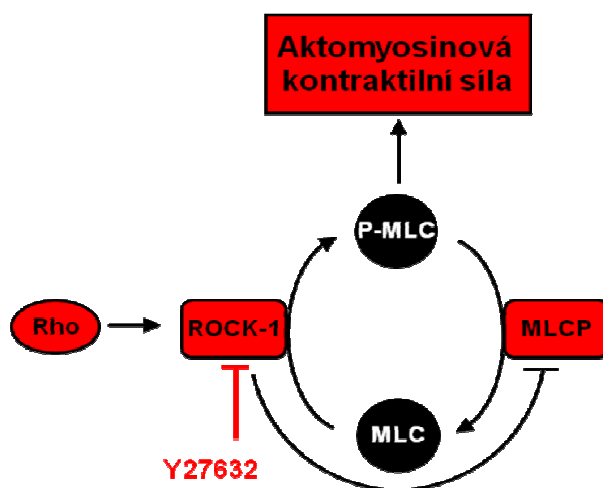
Gel opláchneme vodou a vložíme ho do aktivačního pufru, který umístíme přes noc do termostatu při 37°C.

Po inkubaci gelu v aktivačním pufru gel barvíme Coomassie Blue 30 minut při pokojové teplotě a následně gel odbarvíme v odbarvovacím pufru.

3. Výsledky

3.1. Indukce améboidně-mezenchymálního přechodu melanomových buněk A375M2 pomocí inhibitoru kinázy ROCK Y27632

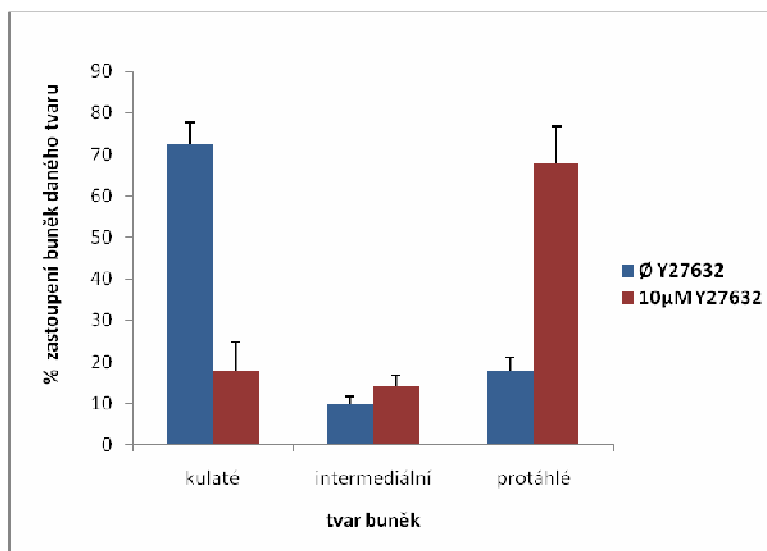
Y-27632 [(+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamid dihydrochlorid] je široce používaný inhibitor serin/threoninové kinázy ROCK. Tento inhibitor blokuje jak izoformu ROCK1, tak izoformu ROCK2 (obr.10). Y27632 se váže do katalytického centra kinázy a jeho účinek lze odstranit přidáním ATP (Ishizaki *et al.*, 2000). Inhibitor Y27632 inhibuje améboidní invazivitu závislou na Rho/ROCK signalizaci u A375M2 buněk a indukuje u těchto buněk améboidně-mezenchymální přechod invazivity (Sahai a Marshall, 2003). Buněčná migrace byla převážně studována v 2D prostředí, které se značně odlišuje od fyziologického 3D stavu. Migrace nádorových buněk je *in vivo* velice komplikovaná odpověď buňky na různorodé chemoatraktanty, složení extracelulární matrix a mimo jiné i na signální interakci s buňkami okolní tkáně (Friedl a Wolf, 2003). Abychom se co nejvíce přiblížili stavu *in vivo*, pracovali jsme s kolagenovými a matrigelovými 3D maticemi. 3D matrice vytvářejí prostorové omezení a biochemické mikroprostředí, které se přibližuje *in vivo* situaci (Friedl a Bröcker, 2000).



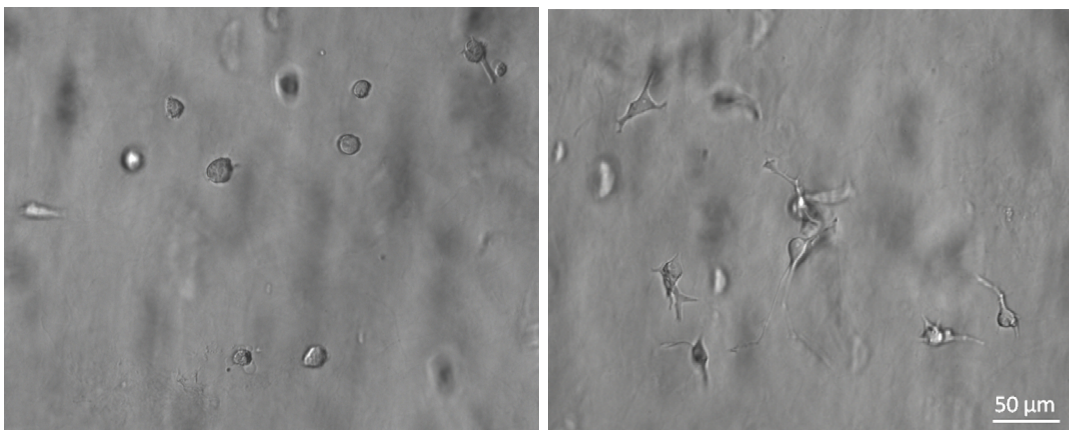
Obr.10. Schéma působení inhibitoru kinázy ROCK Y27632. Aktivace kinázy ROCK vede k aktomyosinové kontraktilní síle. ROCK zvyšuje hladinu fosforylovaného lehkého řetězce myosinu (MLC) jednak přímou fosforylací MLC, a jednak inhibicí fosfatázy MLC (MLCP), která defosforyluje MLC.

3.1.1. Testování morfologie v 3D kolagenu

Kolagenové matrice jsme připravovali jako 0,2% roztok kolagenu typu I (Serva). Po smíchání 500 μ l kolagenové směsi se suspenzí $7 \cdot 10^4$ A375M2 buněk jsme vzniklou směs nepipetovali do jamky 24-jamkové destičky, po ztuhnutí jsme kolagen opatrně převrstvili kultivačním médiem. Améboidně-mezenchymální přechod jsme indukovali 10 μ M inhibítorem kinázy ROCK Y27632, který byl přidán jak do kolagenu, tak do kultivačního média, kterým jsme kolagenový gel převrstvovali. Po 24 hodinách jsme pozorovali morfologii buněk. Vyhodnocovali jsme zastoupení kulatých a protáhlých buněk a buněk, které vykazovaly intermediální morfologií (graf 1). Do skupiny buněk s intermediální morfologií jsme zahrnovali buňky kulatého tvaru, které měly na svém povrchu různé výběžky a filopodia, dále buňky, které nesplňovaly délkošířkový index 1,5 (délkošířkový index je počítán jako podíl délky a šířky buňky) a buňky, u kterých nebylo jednoznačné zařazení do skupin kulaté nebo protáhlé. Do celkového počtu buněk jsme nezahrnovali buňky apoptotické a dělící se buňky. Pro získání signifikantního vzorku jsme manuálně počítali 300-400 buněk. Fotografie buněk jsme pořizovali pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu a objektivu se zvětšením 20x (obr.11).



Graf 1. Zastoupení jednotlivých morfologií A375M2 buněk v 3D kolagenové matrici po působení 10 μ M inhibitoru Y27632. Po přidání 10 μ M inhibitoru kinázy ROCK Y27632 se změnilo procentuální zastoupení jednotlivých morfologií ve prospěch protáhlých buněk. Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů. Při každém pokusu bylo po 24 hodinách vyhodnoceno 300-400 buněk, jednak z kontrolní matrice bez přidaného Y27632, a jednak z matrice s přidaným Y27632.



Obr.11. Fotografie A375M2 buněk v kolagenové matrici. Na první fotografii jsou A375M2 v kolagenové matrici bez inhibitoru Y27632, na druhé fotografii jsou A375M2 v přítomnosti 10 μ M inhibitoru Y27632. Fotografie buněk byly pořízeny po 24 hodinách pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu.

Naším cílem bylo získat buňky kultivované v 3D prostředí, které vykazovaly améboidně-mezenchymální přechod a provést proteomickou analýzu AMT. Neobjevili jsme však žádný způsob jak šetrně, bez ovlivnění fyziologického stavu buněk (např. fosforylace proteinů), rozpustit kolagenovou matrici. Proto jsme museli přistoupit k matrigelovým matricím, které lze za šetrných podmínek rozpustit komerčně dostupným rozpouštědlem.

3.1.2. Testování morfologie v 3D matrigelu

BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix Phenol Red Free je získán rozpuštěním bazální membrány získané z myšího sarkomu. Matrigel je směsí několika složek, hlavní složkou je laminin, dále kolagen typu IV, proteoglykan-heparan sulfát, entaktin/nidogen. Tento matrigel lze rozpustit při 4°C komerčně dostupným rozpouštědlem BD Cell Recovery Solution. Pro tuto vlastnost byly matrigelové matrice vhodným přístupem pro splnění našeho záměru získat proteomickou analýzu améboidně-mezenchymálního přechodu. Práci s matrigelovými matricemi jsme museli nejdříve optimalizovat, aby docházelo k améboidně-mezenchymálnímu přechodu u A375M2 po indukci Y27632 stejně efektivně jako v kolagenových matricích.

Optimalizace podmínek pro analýzu morfologie A375M2 v 3D matrigelu

Všechny pokusy byly prováděny na 96-jamkových destičkách. Celkový objem matrigelové matrice byl 80 μ l a po utuhnutí se matrigel převrstvoval 150 μ l kompletního média DMEM. Inhibitor kinázy ROCK Y27632 byl přidáván do matrigelové matrice i do kompletního média, kterým byla matrice převrstvována. Pro každou jamku bylo použito $1,1 \cdot 10^4$ buněk, které byly smíchány s matrigelem. Pro získání signifikantního výsledku jsme počítali 300 buněk. Buňky jsme vyhodnocovali po 24, 48 a 72 hodinách.

Velkou výhodou použití matrigelových maticí je 100% zastoupení kulatých buněk A375M2 bez přidaného inhibitoru Y27632 za všech provedených podmínek.

Morfologie A375M2 po působení inhibitoru kinázy ROCK Y27632 záleží v matrigelové matici na mnoha faktorech a jejich kombinacích. Záleží na přítomnosti růstových faktorů v matrigelu. Dále závisí na koncentraci matrigelu, na přítomnosti či nepřítomnosti séra (FBS, Sigma), na koncentraci FBS, na koncentraci inhibitoru Y27632, na pořadí přidání inhibitoru Y27632 a na době inkubace s inhibitorem Y27632. Výsledky pokusů byly shrnuty v tabulce 4.

	FBS	Y27632	ředění	kulaté %	intermediální %	protáhlé %
Ø růstové faktory	-	50 μ M	2,5x (3,12 mg/ml)	81	12	7
	+	50 μ M	2,5x (3,12 mg/ml)	79	12	9
			Neředěný (6,53 mg/ml)	43	27	31
		10 μ M	2,5x (3,12 mg/ml)	80	13	7
růstové faktory	-	10 μ M	3x/4x (3,12/1,19 mg/ml)	buňky na dně jamek		
			2,5x (3,80 mg/ml)	62	24	14
			2x (4,75 mg/ml)	63	23	13
	+	50 μ M	2,5x (3,80 mg/ml)	43	23	34
			Neředěný (7,96 mg/ml)	34	28	38
		10 μ M	2,5x (3,80 mg/ml)	58	23	19
			2x (4,75 mg/ml)	57	23	20
			Neředěný (7,96 mg/ml)	51	29	20

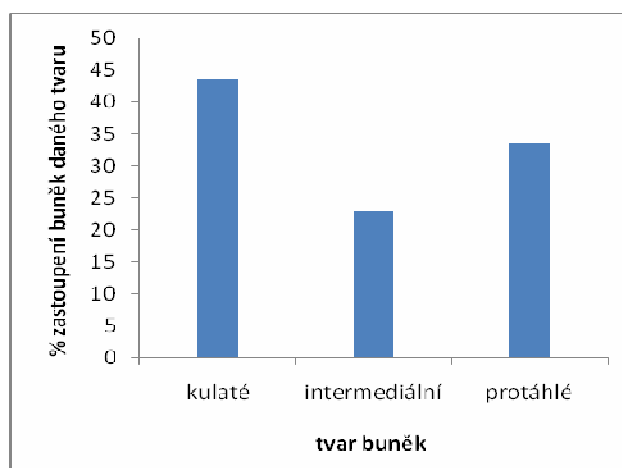
Tab.4. Zastoupení buněk dané morfologie (%) v matrigelu za různých podmínek. Žlutě je zvýrazněno zastoupení jednotlivých typů morfologie A375M2 buněk za podmínek vybraných jako nejlepší pro indukcí AMT.

Buňky A375M2 v matrigelu s růstovými faktory (BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix Phenol Red Free) v neředěné koncentraci vykazovaly po přidání

10 μM inhibitoru Y27632 kulatou morfologii, protáhlých buněk bylo velice nízké procento. A375M2 vykazovaly protáhlejší charakter v matrigelu s růstovými faktory naředěném 2x nebo 2,5x, přesto buňky neměly typicky mezenchymální morfologii. V 3x a 4x ředěném matrigelu s růstovými faktory se buňky ve velké míře vyskytovaly u dna jamek, uvnitř matrigelu se buňky vyskytovaly velice málo, tato koncentrace matrigelu se tedy pro A375M2 prokázala jako příliš řídká. 5x a 10x ředěný matrigel s růstovými faktory ani nezuhl. V těchto pokusech bylo použito kultivační médium DMEM bez přidaného séra (FBS) a ani žádné sérum (FBS) se dodatečně nepřidávalo.

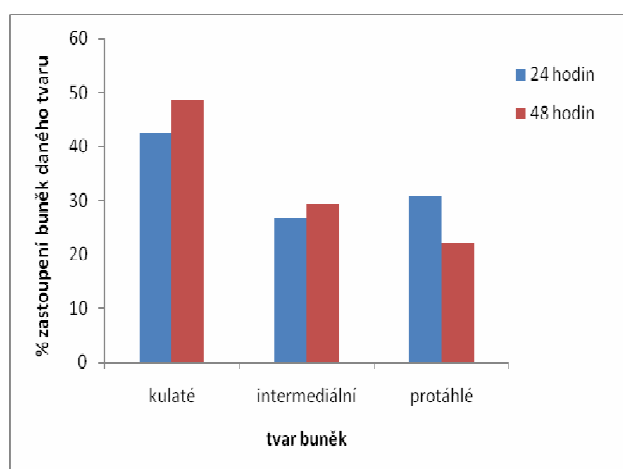
Dále jsme pracovali s 2x a 2,5x ředěným matrigelem s růstovými faktory s přidaným 5% sérem (FBS). Přítomnost 5% séra zvyšovala zastoupení protáhlých buněk, 2,5x ředěný matrigel s růstovými faktory vykazoval o trochu vyšší zastoupení protáhlých buněk než 2x ředěný matrigel s růstovými faktory. Protáhlé buňky byly pozorovány po 24 hodinách, po 48 hodinách byla většina buněk u dna jamky.

Následně jsme v 2,5x ředěném matrigelu s 5% sérem (FBS) zvýšili koncentraci inhibitoru Y27632 na 20 μM a na 50 μM . Inhibitor Y27632 v 20 μM koncentraci neovlivnil zastoupení protáhlých buněk. Nejvyšší zastoupení buněk protáhlého tvaru jsme pozorovali po 24 hodinách při 50 μM koncentraci inhibitoru Y27632 (graf 2). Následující den se zvýšilo zastoupení apoptotických buněk.



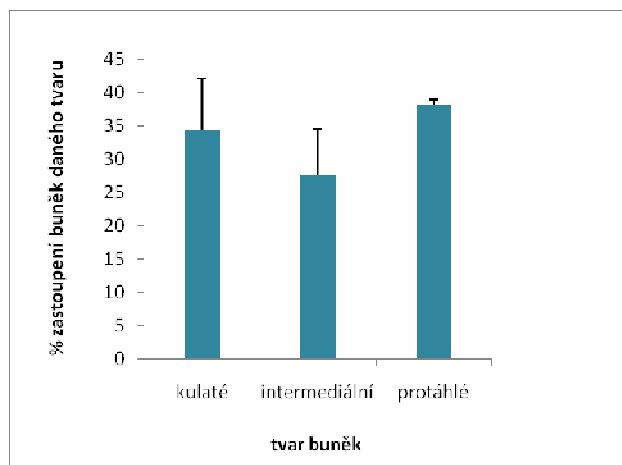
Graf 2. Zastoupení jednotlivých morfologií A375M2 buněk v 3D matrigelové matrici (2,5x ředěné; 3,8mg/ml). Matrigel s růstovými faktory 2,5x ředěný, 5% FBS, 50 μM inhibitor Y27632. Bylo spočítáno 300 buněk po 24 hodinách.

Dále jsme vyzkoušeli matrigel bez růstových faktorů (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced). Buňky v 2,5x ředěném matrigelu bez růstových faktorů s 5% sérem (FBS) nebo bez séra (FBS) měly převážně kulatou morfologii a značný počet buněk byl přítomen na dně jamky. Zastoupení protáhlých buněk nebylo zvýšeno ani pětinasobným zvýšením inhibitoru Y27632. Množství protáhlých buněk bylo zvýšeno v neředěném matrigelu bez růstových faktorů s 5% zastoupením séra (FBS) a s 50 μ M koncentrací inhibitoru Y27632 po 24 hodinách. Po 48 hodinách se zastoupení protáhlých buněk snížilo a přibýlo buněk apoptotických (graf 3).

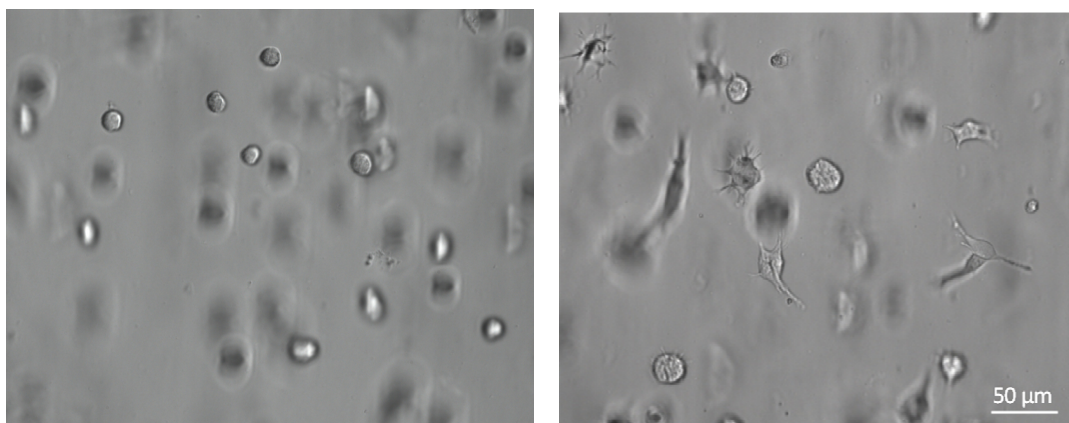


Graf 3. Zastoupení jednotlivých morfologií A375M2 buněk v neředěném 3D matrigelu bez růstových faktorů. Matrigel bez růstových faktorů o koncentraci 6,53mg/ml, 5% FBS, 50 μ M inhibitor Y27632. Bylo spočítáno 300 buněk po 24 a 48 hodinách.

Následně jsme provedli pokus za stejných podmínek jako s neředěným matrigelem bez růstových faktorů, ale použili jsme neředěný matrigel s růstovými faktory. V neředěné matrigelové matrici s růstovými faktory s 5% sérem (FBS) a s 50 μ M koncentrací inhibitoru Y27632 bylo zastoupení typicky protáhlých buněk nejvyšší. Množství protáhlých buněk se ještě zvýšilo přidáním inhibitoru Y27632 před přidáním matrigelu a 10 minutovou inkubací Y27632 s buňkami před přidáním matrigelu s růstovými faktory (graf 4, obr.12). Po 48 hodinách se zastoupení protáhlých buněk nezměnilo, přibýlo ovšem buněk apoptotických.



Graf 4. Zastoupení jednotlivých morfologií A375M2 buněk v neředěném 3D matrigelu s růstovými faktory po působení 50 μ M inhibitoru Y27632. Neředěný matrigel o koncentraci 7,96mg/ml s růstovými faktory, 5% FBS, 50 μ M inhibitor Y27632. Bylo spočítáno 300 buněk po 24 hodinách.



Obr.12. Fotografie A375M2 buněk v 3D matrigelové matrici. Neředěný matrigel s růstovými faktory a 5% FBS. Na první fotografii jsou A375M2 v matrigelové matrici bez Y27632, 100% buněk vykazovalo kulatou morfologii. Na druhé fotografii jsou A375M2 v přítomnosti 50 μ M Y27632. Fotografie buněk byly pořízeny po 24 hodinách pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu.

Při použití neředěného matrigelu s růstovými faktory, 5% séra (FBS) a s 10 μ M/ 20 μ M bylo zastoupení protáhlých buněk výrazně nižší než při použití 50 μ M inhibitoru Y27632. Buňky v přítomnosti 10 μ M/ 20 μ M koncentrace inhibitoru Y27632 nevykazovaly typicky protáhlou morfologii. Morfologie A375M2 se podobala spíše intermediálnímu typu (kulaté buňky se spousty filopodií a buňky nesplňující délkošířkový index). Jako nejlepší podmínky pro indukci AMT u A375M2 buněk v 3D

matrigelu jsme na základě provedených experimentů zvolili použití 50 μM koncentrace inhibitoru Y27632 v neředěném (7,96 mg/ml) matrigelu s růstovými faktory a v přítomnosti 5% séra (Tab. 4).

Pro pokusy v 2D prostředí jsme použili 10 μM koncentraci Y27632, protože větší koncentrace (20, 50 μM) nevedla k dalším morfologickým změnám, a naopak zvyšovala počet apoptotických buněk. Předpokládali jsme tedy, že 50 μM koncentrace inhibitoru Y27632 indukující AMT v matrigelových matricích je ekvivalentní 10 μM koncentraci používané k indukci AMT v kolagenových matricích nebo 2D prostředí. Nutnost zvýšení koncentrace inhibitoru Y27632 pro vyvolání efektivního AMT v matrigelu oproti 2D nebo 3D prostředí v kolagenu může být způsobeno např. vazbou inhibitoru Y27632 na některé složky matrigelové směsi. Tuto skutečnost potvrzuje i zvýšené zastoupení protáhlých buněk v případě inkubace buněk s inhibitorem Y27632 před přidáním matrigelu.

3.2. Rozpuštění matrigelových matricí a získání buněk z 3D prostředí

Optimalizaci podmínek indukce améboidně-mezenchymálního přechodu v 3D matrigelových matricích jsme prováděli na 96-jamkové destičce a při koncentraci $1,1 \cdot 10^4$ buněk na 80 μl . Abychom získali z 3D matrice dostatečné množství buněk, se kterým bychom mohli dále pracovat na SDS-PAGE, museli jsme pracovat s 24-jamkovou destičkou, která má větší objem jamek.

Dále jsme se snažili navýšit koncentraci buněk v matrici, aby byl výtěžek buněk na objem matrice co možná nejvyšší. Jako optimální koncentrace buněk, při které dochází k efektivnímu améboidně-mezenchymálnímu přechodu se ukázala koncentrace $1,25 \cdot 10^5$ buněk na 500 μl matrigelové matrice. Při vyšší koncentraci buněk (např. $5 \cdot 10^5$ buněk na 500 μl kolagenové matrice) se snižovalo zastoupení protáhlých buněk a výrazně přibývalo buněk kulaté morfologie. Ukázali jsme, že efektivnost améboidně-mezenchymálního přechodu záleží kromě výše popsaných podmínek i na hustotě buněk v 3D matrici.

BD Matrigel lze při 4°C rozpustit komerčně dostupným rozpouštědlem BD Cell Recovery Solution. Abychom zajistili standardní podmínky všech pokusů, prováděli jsme rozpouštění matrigelové matrice vždy v chladové místnosti při 2-4°C. Všechny nástroje a roztoky jsme nechali předem vychladit v chladové místnosti.

Buňky jsme pěstovali 24 hodin v neředěném matrigelu s růstovými faktory s 5% sérem a 50 μM inhibitorem Y27632 na 24-jamkové destičce. Matrigelovou matici o objemu 500 μl jsme rozpustili 2 ml rozpouštědla BD Cell Recovery Solution za 45-60 minut. Po rozpouštění jsme tuto směs centrifugovali v předchlazené centrifuze. Sediment buněk jsme následně dvakrát promyli v malém objemu nejdříve 1x PBS a následně v médiu DMEM bez séra. Buňky jsme získali v jejich fyziologickém stavu, kdy nemají porušené adhezivní molekuly, které jsou zničeny například trypsinizací. Malý objem promývacího agens snížil ztráty buněk v důsledku adheze buněk na stěny centrifugační zkumavky. Použití média DMEM v druhém kroku promývání také snížilo ztráty buněk. S buňkami se muselo zacházet velice opatrně, bylo nutné se vyvarovat nadměrným otřesům a prudkému pipetování. Šetrné zacházení výrazně zvýšilo počet neporušených buněk.

Získaný sediment buněk byl lyzován lyzačním pufrem. Byly připraveny vzorky na dvě nanášky SDS-PAGE. Rozhodli jsme se pomocí metody Western blot ověřit, zda dochází k améboidně-mezenchymálnímu přechodu po působení inhibitoru Y27632 u melanomových buněk A375M2. Jako možný marker mezenchymální invazivity jsme vybrali fosforylovaný paxilin a fosforylovanou kinázu FAK. I přesto, že výsledek byl negativní, jsme se rozhodli pro proteomickou analýzu AMT indukovaného inhibitorem Y27632 u buněk A375M2.

3.3. Příprava buněk A375M2 pro proteomickou analýzu

Pro proteomickou analýzu jsme připravili buňky pěstované v 2D prostředí a buňky kultivované v 3D prostředí.

Buňky z 2D prostředí jsme získali kultivací A375M2 na plastiku. Inhibitor Y27632 v 10 μM koncentraci byl přidán 24 hodin před trypsinizací. Pro proteomickou analýzu bylo odebráno $2 \cdot 10^6$ buněk, po centrifugaci byl sediment buněk uchován v kontejneru s tekutým dusíkem.

Buňky z 3D prostředí jsme získali přípravou matrigelu dle protokolu pro přípravu 3D matrigelu v 24-jamkové destičce. Připravili jsme si směs matrigelu s buňkami tak, aby na třech jamkách 6-jamkové destičky bylo celkem $2,4 \cdot 10^6$ buněk, což odpovídá optimální koncentraci buněk zjištěné na 24-jamkové destičce. Takto jsme připravili také tři jamky 6-jamkové destičky s 50 μM inhibitorem Y27632. Volili jsme vyšší počet

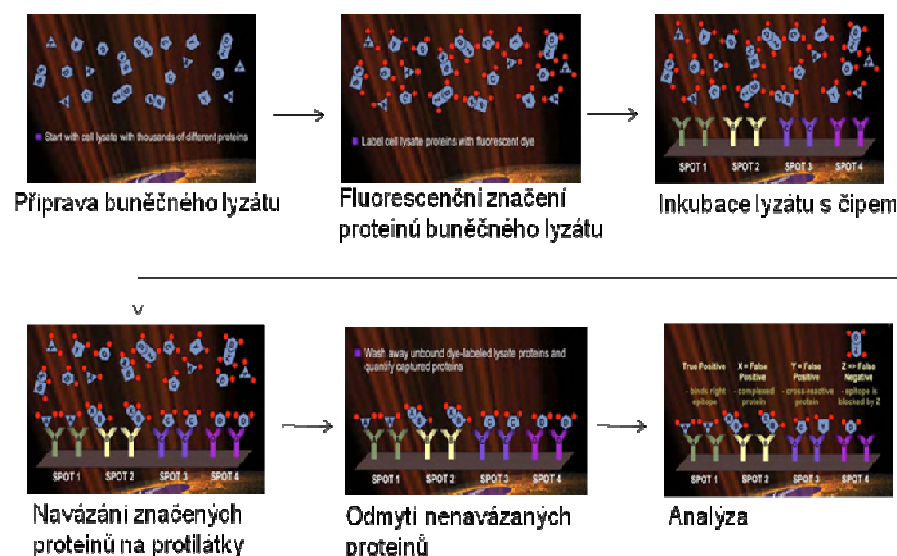
buněk, abychom kompenzovali ztrátu buněk, ke které dochází při rozpouštění matrigelové matrice. Na každou jamku 6-jamkové destičky jsme pipetovali 3,2 ml matrigelové směsi s buňkami. Po 60 minutách jsme tuhý matrigel převrstvili 2 ml kompletního média DMEM, případně kompletním médiem DMEM s 50 μ M koncentrací inhibitoru Y27632. Po 24 hodinách jsme matrigelovou matici rozpustili. Získaný sediment buněk jsme umístili do kontejneru s tekutým dusíkem.

3.4. Proteomická analýza A375M2 provedená firmou Kinexus

Dodali jsme A375M2 buňky pěstované v 2D prostředí a buňky z 3D prostředí, ve kterých jsme indukovali améboidně-mezenchymální přechod 10 μ M/ 50 μ M koncentrací inhibitoru Y27632. Připravili jsme přibližně $2 \cdot 10^6$ buněk z každého prostředí, kontrolní vzorky byly buňky kultivované za stejných podmínek v nepřítomnosti Y27632. Buňky jsme dodali ve formě zamraženého peletu.

Proteomická analýza byla provedena firmou Kinexus (EXPANDED KINEX™ 800 ANTIBODY MICROARRAY SERVICE). Pro analýzu využívá 500 pan-specifických a 300 fosfo-specifických protilátek. Proteomická analýza probíhá v několika krocích schematicky znázorněných na následujícím schématu (obr.13).

Ze zamraženého peletu buněk se připraví buněčný lyzát, který se následně označí fluorescenčními značkami. Fluorescenčně značené proteiny se inkubují s čipem, na kterém jsou v duplikátech protilátky. Po navázání fluorescenčně značených proteinů na protilátky jsou nenavázané proteiny a další součásti lyzátu odmyty z čipu. Následně probíhá analýza získaných intenzit fluorescence jednotlivých spotů na čipu.



Obr.13. Schéma znázorňující pořadí kroků proteomické analýzy provedené firmou Kinexus. (převzato a upraveno z www.kinexus.ca.)

3.5. Výsledek proteomické analýzy

Prottilátky jsou nanoseny na čipu v duplikátech. Hodnoty byly získány odečtením intenzity fluorescence pozadí od celkové intenzity fluorescence spotu. Tyto hodnoty byly dále normalizovány, aby se odstranily chyby způsobené odlišnou koncentrací kontrolního vzorku a vzorku s inhibítorem Y27632. Normalizace poskytuje přesnější výsledky a odstraňuje falešně pozitivní výsledky. Byl spočítán průměr dvou normalizovaných hodnot získaných z duplicitních spotů. Následně byl proveden podíl hodnot intenzit fluorescence vzorku s Y27632 a kontrolního vzorku.

Získaná data jsme museli vytřídit. Vyloučili jsme proteiny, u kterých nebyly pozorovány signifikantní ($P > 0.05$) rozdíly intenzit fluorescence po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibítorem Y27632. Pro další analýzu jsme pracovali pouze s proteiny, jejichž podíl intenzit fluorescence byly nad 1,5 nebo pod 0,5. U proteinů jejichž podíl intenzit fluorescence byl nad hodnotu 1,5 (včetně hodnoty 1,5), byla zvýšena hladina exprese/fosforylace po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibítorem Y27632. Tyto proteiny jsme považovali za „promezenchymální“ proteiny. U proteinů jejichž podíl intenzit fluorescence byl pod hodnotu 0,5 (včetně hodnoty 0,5), byla snížena hladina exprese/fosforylace po indukci améboidně-

mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632. Tyto proteiny jsme považovali za „proaméboidní“ proteiny.

Ze získaného seznamu dat jsme dále vyloučili proteiny, jejichž hodnoty odchylek od průměru normalizovaných hodnot intenzity fluorescence byly vyšší než 50%.

Odstranili jsme také proteiny, které nebyly analyzovány pouze jedním typem protilátky, ale byly analyzovány několika různými protilátkami a výsledkem bylo získání odlišných podílů hodnot intenzit fluorescence u jednoho proteinu. Proteiny s průměry těchto intenzit fluorescence, které neodpovídaly hodnotám nad 1,5, nebo pod 0,5 jsme z tabulky dat vyloučili.

Získali jsme 92 proteinů, u kterých se vlivem indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina exprese. U 51 proteinů se po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina fosforylace (viz příloha 1).

3.6. KEGG databáze (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Získali jsme 42 proteinů z 3D prostředí a 66 proteinů z 2D prostředí, u kterých se vlivem indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina exprese. U 27 proteinů z 3D prostředí a 32 proteinů z 2D prostředí se po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina fosforylace (tab.5).

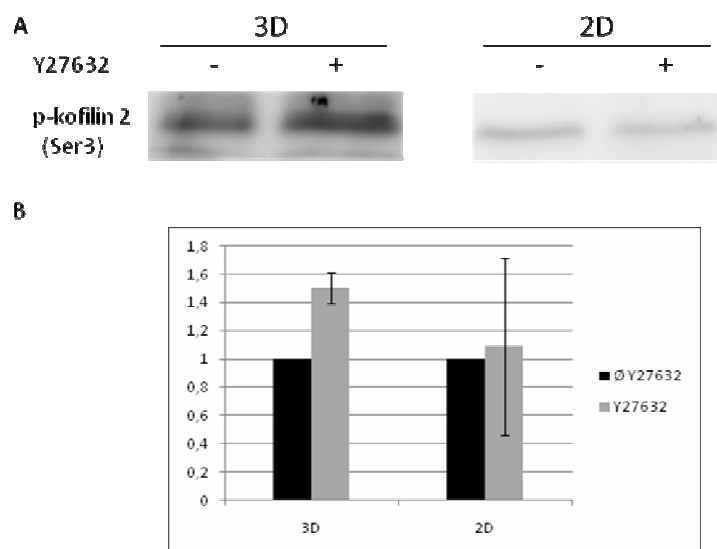
	Společné 2D a 3D	2D	3D
↑ 1,5	13	34	13
↓ 0,5	4	15	12
Fosforylace ↑ 1,5	4	15	12
Fosforylace ↓ 0,5	4	9	7

Tab.5. Počet ovlivněných proteinů po indukci AMT inhibitorem Y27632. Počet proteinů se zvýšenou hladinou exprese (červené) a se sníženou hladinou exprese (modré), počet proteinů se zvýšenou hladinou fosforylace (žluté) a se sníženou hladinou fosforylace (zelené). Rozdělení počtu proteinů s ohledem na 2D a 3D prostředí a s ohledem na proteiny, které se změnily jak v 2D, tak i 3D prostředí.

Abychom získali globální představu o signálních kaskádách, kterých se proteiny získané proteomickou analýzou účastní, využili jsme KEGG databázi (www.genome.jp/kegg/). V KEGG databázi jsme použili nástroj „KEGG pathway→ Color objects in KEGG pathways“, který umožňuje vizualizaci zadaných proteinů v jednotlivých signálních drahách definovaných v KEGG databázi. Pro označení proteinů nalezených KINEXUS microarray analýzou jsme vybrali následující barevné kódování. Červené pro proteiny, u kterých byla zjištěna zvýšená hladina exprese po indukci AMT. Modré pro proteiny, u kterých byl proteomickou analýzou zjištěn pokles hladiny exprese po indukci AMT. Žluté označení pro proteiny, u kterých bylo zaznamenáno zvýšení míry fosforylace po indukci AMT. Zelené označení pro proteiny, které po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 vykazovaly sníženou hladinu fosforylace. (PKC je označena šedě, neboť se v datech získaných proteomickou analýzou vyskytovala v několika izoformách, které se vzájemně lišily hladinou exprese a fosforylace). Analýza KINEXUS microarray dat ukázala, že nejvíce jsou indukcí AMT pomocí inhibitoru Y27632 ovlivněny signální dráhy regulující: aktinový cytoskelet, fokální adheze, buněčný cyklus a apoptózu (viz. příloha 2).

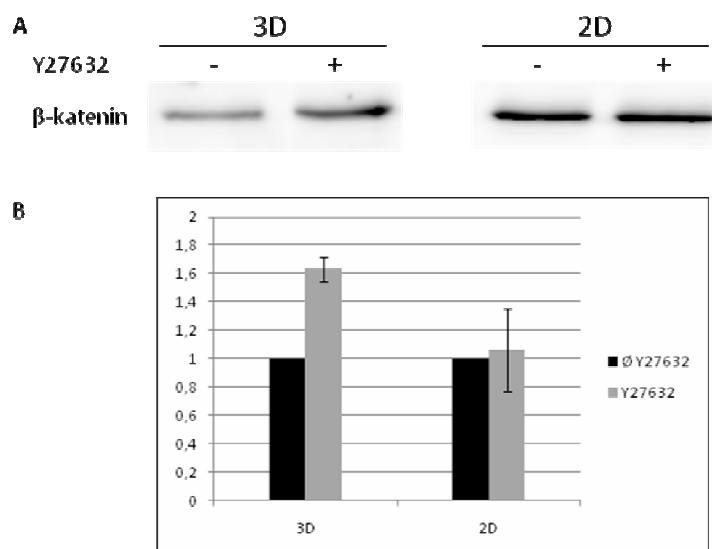
3.7. Ověření signifikantnosti výsledků proteomické analýzy

Jedním z proteinů, u kterého indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 vyvolala v 3D prostředí zvýšení hladiny fosforylace byl kofilin 2 na serinu 3. Podíl intenzit fluorescence získaný proteomickou analýzou vzorku s inhibitorem Y27632 a kontrolního vzorku bez inhibitoru byl v 3D prostředí 2,26. Ve 2D prostředí nedošlo ke zvýšení fosforylace kofilinu 2. Zvýšení hladiny fosforylace kofilinu 2 v 3D prostředí jsme ověřili metodou Western blot (obr.14).



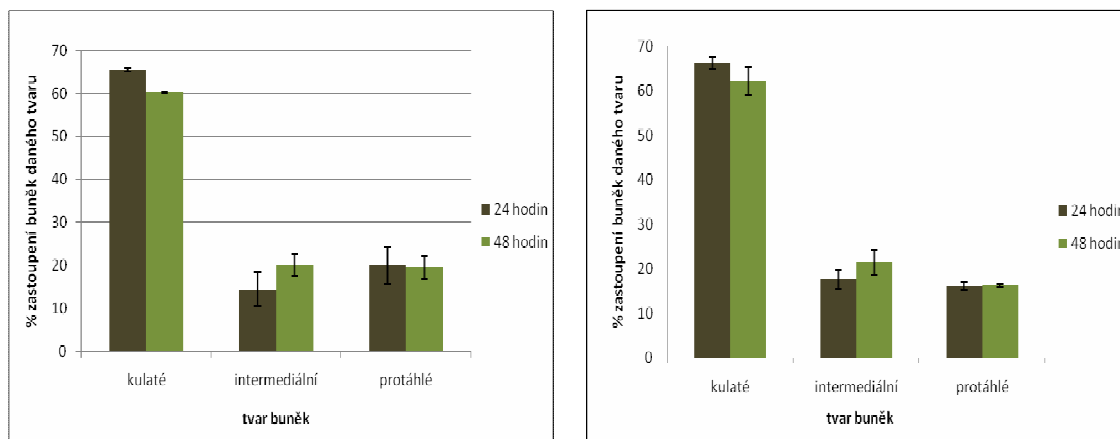
Obr.14. Imunoblotty fosforylovaného kofilinu 2 (Ser3) o velikosti 19 kDa a jejich kvantifikace. Zvýšená hladina fosforylace kofilinu 2 na serinu 3 v 3D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu 50 μ M inhibitorem Y27632. Ve 2D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu 10 μ M inhibitorem Y27632 nebyly pozorovány signifikantní ($P > 0.05$) změny. A) Reprezentativní imunoblotty fosforylovaného kofilinu 2 (Ser3) v 3D a 2D prostředí. B) Densitometrická kvantifikace fosforylovaného kofilinu 2. Densitometrická kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Image Quant TL 5.0. Data byla získána ze tří nezávislých pokusů v přítomnosti (+) a nepřítomnosti (-) inhibitoru Y27632. Kvantifikace fosforylovaného kofilinu 2 v přítomnosti Y27632 je zobrazena jako násobek kvantifikace fosforylovaného kofilinu 2 bez inhibitoru Y27632. Statistické ověření spolehlivosti dat bylo získáno na základě dvouvýběrového Studentova t-testu.

Dalším proteinem, u kterého indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 vyvolala v 3D prostředí změnu, byl β -katenin. V 3D prostředí se zvýšila hladina exprese β -kateninu. Podíl intenzit fluorescence vzorku s inhibitorem Y27632 a kontrolního vzorku bez Y27632 byl v 3D prostředí 2,37. Ve 2D prostředí nedošlo k signifikantnímu ($P > 0.05$) zvýšení exprese tohoto proteinu. Zvýšení hladiny exprese β -kateninu v 3D prostředí jsme ověřili metodou Western blot (obr.15).



Obr.15. Imunoblots β -kateninu o velikosti 92 kDa a jejich kvantifikace. Zvýšená hladina exprese β -kateninu v 3D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu 50 μ M inhibitorem Y27632. Ve 2D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu 10 μ M inhibitorem Y27632 nebyly pozorovány signifikantní ($P > 0.05$) změny exprese β -kateninu. A) Reprezentativní imunoblots β -kateninu v 3D a 2D prostředí. B) Densitometrická kvantifikace β -kateninu. Densitometrická kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Image Quant TL 5.0. Data byla získána ze tří nezávislých pokusů v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) inhibitoru Y27632. Kvantifikace β -kateninu v přítomnosti Y27632 je zobrazena jako násobek kvantifikace β -kateninu bez inhibitoru Y27632. Statistické ověření spolehlivosti dat bylo získáno na základě dvouvýběrového Studentova t-testu.

β -katenin je v buňce fosforylován kinázou GSK3 a tato fosforylace cílí β -katenin do proteasomu. Chtěli jsme zjistit, jestli inhibice kinázy GSK3 povede ke změně morfologie melanomových buněk A375M2. Použili jsme LiCl, který se využívá jako inhibitor kinázy GSK3 a k aktivaci Wnt signalizace (Klein a Melton, 1996). Připravili jsme 0,2% kolagenové matrice se $7 \cdot 10^4$ buňkami a přidali jsme 3 mM LiCl do kolagenové matrice i do média, kterým jsme matrici převrstvovali. Inhibice GSK3 pomocí LiCl neovlivnila morfologii buněk po 24 hodinách ani po 48 hodinách. Zastoupení jednotlivých morfologií odpovídalo kontrolním buňkám bez přidaného LiCl (graf 5).



A) 0 LiCl

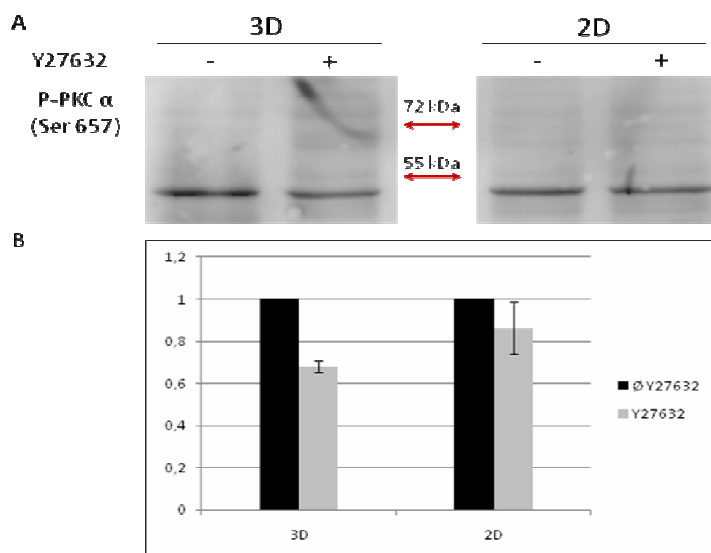
B) 3 mM LiCl

Graf 5. Zastoupení jednotlivých typů morfologií A375M2 buněk v 3D kolagenové matrici po působení 3 mM LiCl. A) Kontrolní buňky A375M2 bez LiCl. B) Buňky A375M2 v přítomnosti 3 mM LiCl. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých pokusů. Při každém pokusu bylo vyhodnocováno 300 buněk jednak z kontrolní matrice bez přidaného LiCl, a jednak z matricí s přidaným 3 mM LiCl. Buňky byly analyzovány po 24 a 48 hodinách.

Jedním z proteinů, u kterých indukce améboidně-mezenchymálního přechodu vedla ke snížení hladiny fosforylace, byla α izoforma protein kinázy C (PKC α). U tohoto proteinu byla fosforylace snížena na serinu 657 ve 3D i ve 2D prostředí. Podíl intenzit fluorescence vzorku s inhibitorem Y27632 a kontrolního vzorku bez inhibitoru Y27632 byl v 3D prostředí 0,31 a ve 2D prostředí 0,39. Serin 657 se nalézá v hydrofobním motivu PKC α a jeho fosforylace spolu s fosforylací threoninu 497 v aktivační smyčce je nezbytná pro aktivaci PKC α (Cazaubon *et al.*, 1994; Gysin a Imber, 1997). Fosforylace serinu 657 je tudíž odrazem aktivace PKC α . Fosfo-specifickou protilátkou od Santa Cruz Biotechnology se nám bohužel nepodařilo detekovat specifický proužek, který by odpovídal nativní formě PKC α o velikosti 80 kDa. Vždy jsme však detekovali velice silný proužek o velikosti cca 50 kDa. U vzorků z 3D prostředí v přítomnosti 50 μ M inhibitoru Y27632 vykazoval tento proužek snížení oproti kontrole bez přidaného Y27632 (obr.16). Toto snížení fosforylace fragmentu odpovídá datům získaným proteomickou analýzou. Vzorky z 2D prostředí nevykazovaly výrazné snížení míry fosforylace 50 kDa fragmentu v přítomnosti 10 μ M inhibitoru Y27632 (obr.16).

V apoptotických buňkách je kináza PKC α proteolyticky štěpena kalpainem (Touyarot *et al.* 2000; Leverrier *et al.*, 2002). Výsledný fragment o velikosti 46 kDa

obsahuje kinázovou doménu a je vysoce aktivní (Touyarot *et al.* 2000; Leverrier *et al.*, 2002). Předpokládáme, že námi detekovaný proužek o velikosti přibližně 50 kDa je právě tímto fragmentem aktivované PKC α .

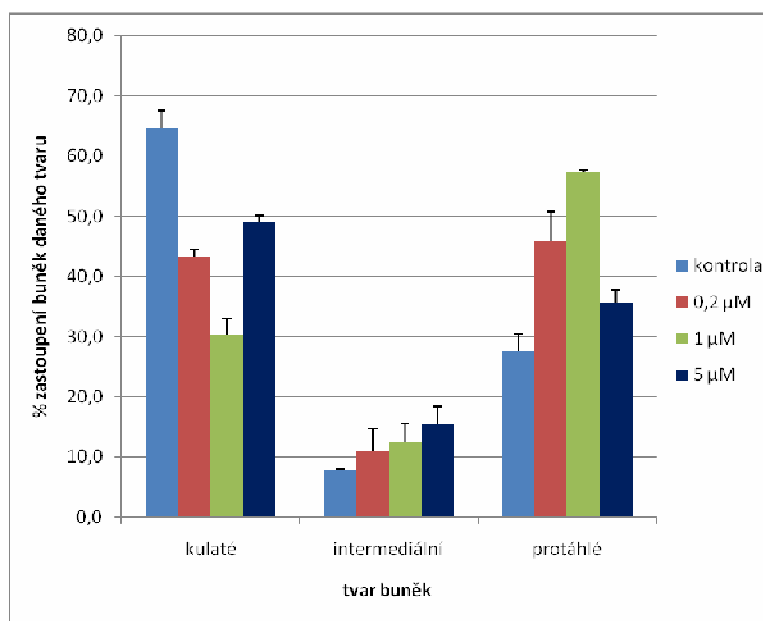


Obr.16. Imunoblots fosforylované kinázy PKC α (Ser657) a jejich kvantifikace. Protilátkou od Santa Cruz Biotechnology se nám nepodařilo detekovat specifický proužek, který by odpovídal nativní 80 kDa fosforylované formě PKC α . Detekovali jsme velice silný proužek o velikosti cca 50kDa. U tohoto 50 kDa fragmentu byl ve 3D prostředí po indukci AMT 50 μ M inhibitorem Y27632 pozorován pokles hladiny fosforylace. Ve 2D prostředí nebyl pozorován po indukci AMT 10 μ M inhibitorem Y27632 signifikantní ($P > 0.05$) pokles hladiny fosforylace tohoto fragmentu. A) Reprezentativní imunoblots fosforylované PKC α (Ser657) o velikosti 80 kDa a cca 50 kDa v 3D a 2D prostředí. B) Densitometrická kvantifikace 50 kDa fragmentu PKC α . Densitometrická kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Image Quant TL 5.0. Data byla získána ze tří nezávislých pokusů v přítomnosti (+) a nepřítomnosti (-) inhibitoru Y27632. Kvantifikace PKC α v přítomnosti Y27632 je zobrazena jako násobek kvantifikace PKC α bez inhibitoru Y27632. Statistické ověření spolehlivosti dat bylo získáno na základě dvouvýběrového Studentova t-testu.

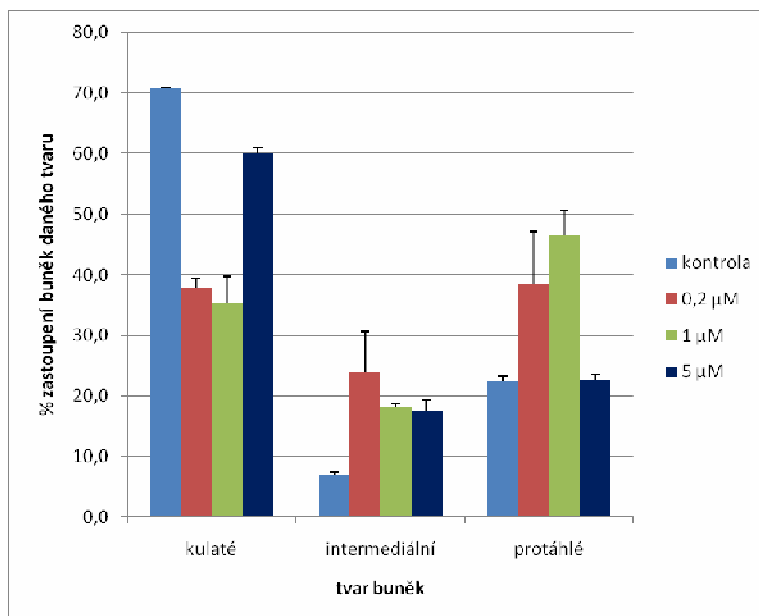
Chtěli jsme zjistit, jestli se PKC α podílí na regulaci améboidní migrace a jestli má vliv na améboidně-mezenchymální přechod melanomových buněk A375M2. Rozhodli jsme se inhibovat aktivitu PKC α pomocí inhibitoru Gö6976. Připravili jsme kolagenové matrice jako 0,2% roztok kolagenu typu I (Serva) s $7 \cdot 10^4$ buňkami. Použili jsme tři různé koncentrace inhibitoru Gö6976. Běžně používanou koncentraci 1 μ M a 5x nižší a 5x vyšší koncentraci. Inhibitor jsme přidávali jak do kolagenové matrice, tak do kultivačního média, kterým jsme kolagenový gel převrstvovali. Po 24 a 48 hodinách jsme pozorovali morfologii buněk. Vyhodnocovali jsme zastoupení kulatých

a protáhlých buněk a buněk, které vykazovaly intermediální morfologií. Pro získání signifikantního vzorku jsme manuálně počítali 300 buněk. Fotografie buněk jsme pořizovali pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu a objektivu se zvětšením 20x (obr.17).

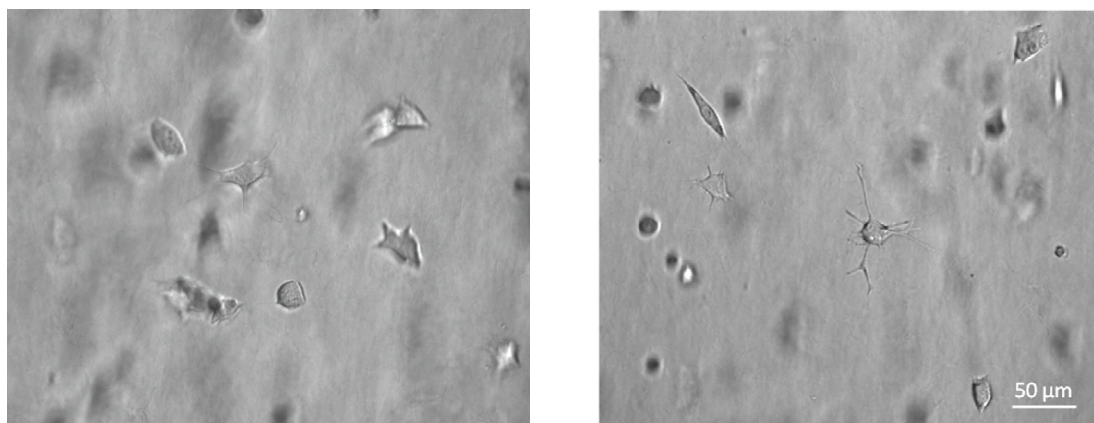
Nejvyšší účinek na změnu morfologie měla 1 μM koncentrace inhibitoru Gö6976. Po 24 hodinách téměř 60 % buněk vykazovalo protáhlou morfologii. 0,2 μM koncentrace inhibitoru Gö6976 měla nižší účinnost na změnu morfologie A375M2 buněk. Překvapivě při 5 μM koncentraci inhibitoru Gö6976 nebyla pozorována výrazná změna ve prospěch protáhlé morfologie buněk. Při této koncentraci převažovalo zastoupení buněk kulaté morfologie (graf 6). Po 48 hodinách se počet protáhlých buněk v přítomnosti všech koncentrací inhibitoru Gö6976 snížil (graf 7).



Graf 6. Zastoupení jednotlivých typů morfologií A375M2 buněk v 3D kolagenové matrici po působení rozdílné koncentrace inhibitoru PKC α Gö6976 po 24 hodinách. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých pokusů. Při každém pokusu bylo vyhodnocováno 300 buněk jednak z kontrolní matrice bez přidaného inhibitoru, a jednak z matricí s přidanými inhibitory.



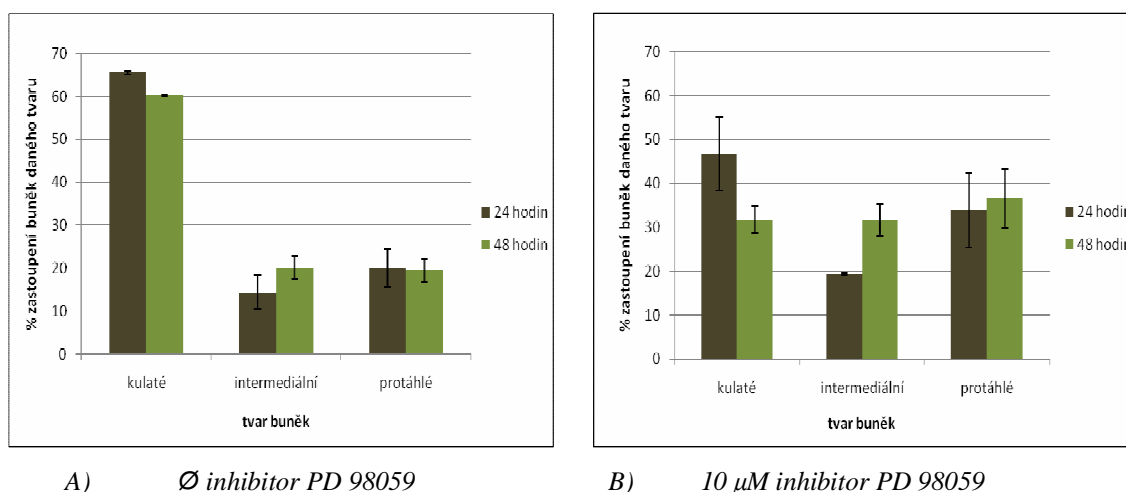
Graf 7. Zastoupení jednotlivých typů morfologií A375M2 buněk v 3D kolagenové matrici po působení rozdílné koncentrace inhibitoru PKCa Gö6976 po 48 hodinách. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých pokusů. Při každém pokusu bylo vyhodnocováno 300 buněk jednak z kontrolní matrice bez přidaného inhibitoru, a jednak z matricí s přidanými inhibitory.



Obr.17. Fotografie A375M2 buněk v kolagenové matrici v přítomnosti inhibitoru kinázy PKCa Gö6976. Na první fotografii jsou A375M2 v kolagenové matrici s 0,2 μM inhibitorem kinázy PKCa Gö6976, na druhé fotografii jsou A375M2 v přítomnosti 1 μM inhibitorem PKCa Gö6976. Fotografie buněk byly pořízeny po 24 hodinách pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000 s využitím Hoffmanova modulačního kontrastu.

3.8. MAPK dráha

Z dat získaných proteomickou analýzou vyplývá, že indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 ovlivňuje některé proteiny MAPK signálních drah (Erk5, MEK, JNK2). Proto jsme chtěli zjistit, jaký účinek bude mít na morfologii buněk použití inhibitoru MAPK dráhy PD 98059. Tento inhibitor neinhibuje přímo aktivitu kinázy MAPK, ale inhibuje MAPKK (MEK kináza, MAPK/ERK kináza), která aktivuje kinázu MAPK. Připravili jsme kolagenové matrice se $7 \cdot 10^4$ buňkami a přidali jsme 10 μM inhibitor PD 98059 do kolagenové matrice i do média, kterým jsme matrici převrstvovali. Po 24 hodinách se zvýšilo zastoupení protáhlých buněk na 35 % (graf 8). Po 48 hodinách se zastoupení protáhlých buněk ještě mírně zvýšilo a zvýšil se počet buněk s intermediální morfologií. Zastoupení buněk kulaté morfologie bylo po 48 hodinách cca 30 % (graf 8).



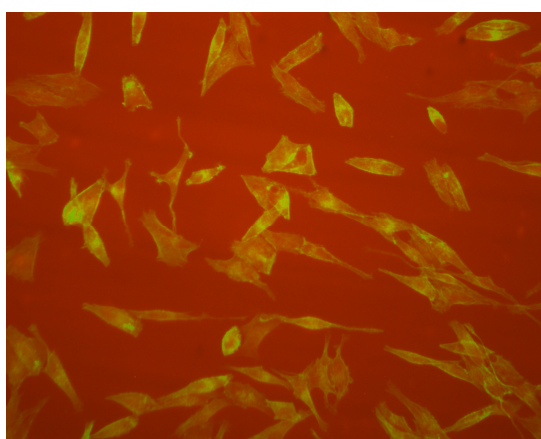
Graf 8. Zastoupení jednotlivých typů morfologií A375M2 buněk v 3D kolagenové matrici po působení 10 μM inhibitoru PD 98059. A) Kontrolní buňky A375M2 bez inhibitoru PD 98059. B) Buňky A375M2 v přítomnosti 10 μM inhibitoru PD 98059. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých pokusů. Při každém pokusu bylo vyhodnocováno 300 buněk jednak z kontrolní matrice bez přidaného inhibitoru, a jednak z matricí s přidaným inhibitorem. Buňky byly analyzovány po 24 a 48 hodinách.

3.9. Přítomnost proteolytických enzymů a proteolytické degradace

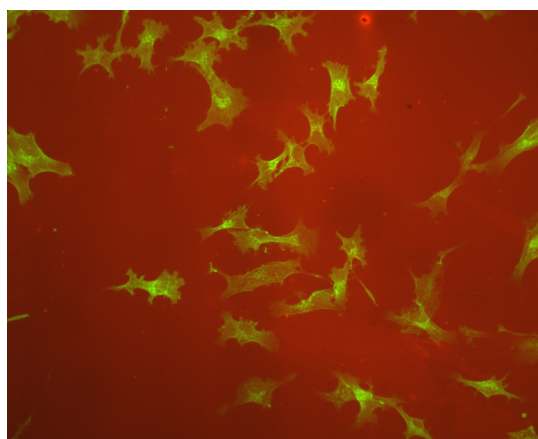
Nádorové buňky invadující mezenchymálním způsobem jsou závislé na produkci extracelulárních proteáz, které degradují extracelulární hmotu a tím remodelují ECM.

Abychom zjistili, jestli se změní schopnost extracelulární proteolýzy po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632, provedli jsme pokus se sklíčky pokrytými želatinem konjugovaným s fluorescenční značkou, který je degradovatelný proteázami vylučovanými buňkami.

Sklíčka jsme pokryli želatinem konjugovaným s fluorescenční značkou AlexaFluor633. Na sklíčka jsme vyseli buňky na konečnou 20% konfluenci. A indukovali jsme améboidně-mezenchymální přechod 10 μ M inhibitorem Y27632. Buňky jsme pěstovali v médiu DMEM bez séra i v kompletním médiu DMEM se sérem. Sklíčka jsme fixovali po jednom, dvou a třech dnech. Buňky výrazně změnily morfologii vlivem působení inhibitoru Y27632, ale ani v jednom uspořádání pokusu jsme nepozorovali degradaci želatinu buňkami (obr.18). Degradace želatinové matrice je doprovázena tvorbou tmavých skvrn, vytvořených v místech adheze buněk na želatin.



Ø Y27632



10 μ M Y27632

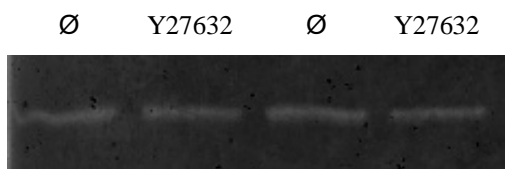
Obr.18. Buňky A375M2 na sklíčkách pokrytých želatinem konjugovaným s fluorescenční značkou AlexaFluor633. Buňky kultivovány v médiu bez séra. Sklíčka fixována 3 dny po vysetí buněk. F-aktin buněk byl obarven faloidinem AlexaFluor488. Fotografie buněk byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TS 2000, byl použit objektiv se zvětšením 20x.

Mezi extracelulární proteázy se řadí matrixové metaloproteázy (MMP), membránově vázané matrixové metaloproteázy (MT-MMP), uPa (urokinase-type plasminogen activator) a další proteázy. Matrixové metaloproteázy jsou endopeptidázy závislé na molekule zinku (Bode a Maskos, 2003). Jsou sekretovány ve formě zymogenu (neboli pro-formy) a jsou extracelulárně aktivovány (Bode a Maskos, 2003). Pro ověření přítomnosti případně aktivity metaloproteáz po působení inhibitoru Y27632

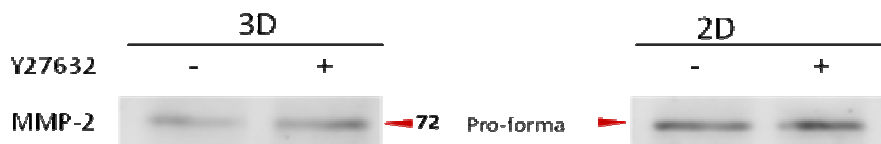
jsme analyzovali želatinázovou aktivitu prostřednictvím želatinové zymografie a pro zjištění hladiny exprese vybraných proteáz jsme použili metodu Western blot.

Den předem jsme si připravili dvě velké misky s 80% konfluencí buněk, které jsme kultivovali 24 hodin v médiu bez séra. Následující den jsme vyseli $2 \cdot 10^5$ buněk do 500 μ l kompletního média na jednu jamku 24-jamkové destičky. Po přisednutí buněk jsme vyměnili kompletní médium DMEM za bezsérové médium. Po 72 hodinách jsme odebrali médium. Za nedenaturačních podmínek jsme médium smíchali s vzorkovým pufrům bez DTT a nanесли je na polyakrylamidový gel s želatinovým substrátem. Po elektroforetickém rozdělení vzorku jsme gel inkubovali v renaturačním pufru a přes noc v aktivačním pufru.

Kontrolní buňky A365M2 i buňky inkubované s 10 μ M inhibitorem Y27632 sekretovaly stejné množství metaloproteáz (obr.19). Tato matrixová metaloproteáza byla pravděpodobně pro-forma MMP-2. Oblast degradovaného želatinu na polyakrylamidovém gelu s želatinovým substrátem obarveném Coomassie Blue velikostně odpovídala místu detekce pro-formy MMP-2 pomocí metody Western blot. Hladina exprese MMP-2 detekovaná pomocí metody Western blot nebyla změněna po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 v 2D prostředí. Ve 3D prostředí došlo k nepatrnému zvýšení pro-formy MMP-2 v buňce (obr.20).

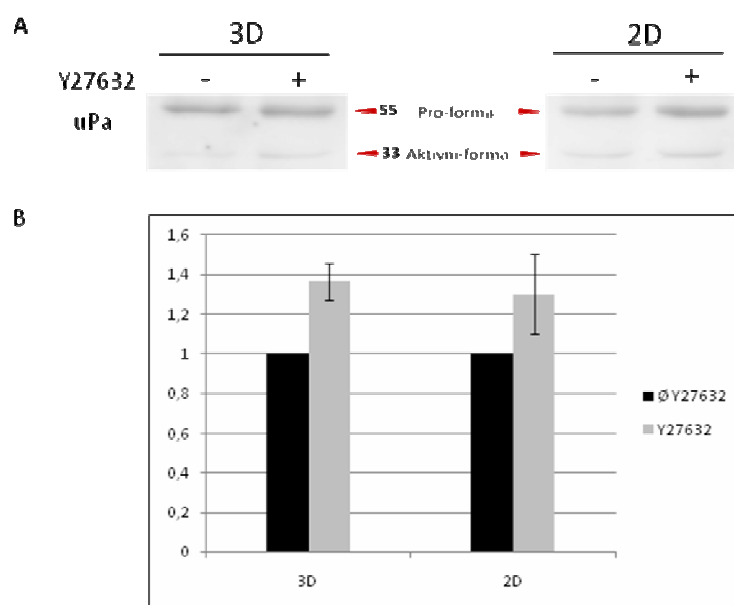


Obr.19. Želatinová zymografie buněčné linie A375M2 v přítomnosti a nepřítomnosti 10 μ M inhibitoru Y27632. Médium bylo odebráno po 72 hodinách. Vzorky byly elektroforeticky rozděleny v 10% polyakrylamidovém gelu s želatinovým substrátem. Místa degradace substrátu pro-formou MMP2 se po obarvení Coomassie Bluejevila jako světlé plochy na modrofialovém pozadí.



Obr.20. Imunobloty pro-formy MMP-2 o velikosti 72 kDa. Hladina exprese pro-formy MMP-2 se ve 2D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 nezměnila. V 3D prostředí se exprese pro-formy MMP-2 nepatrně zvýšila.

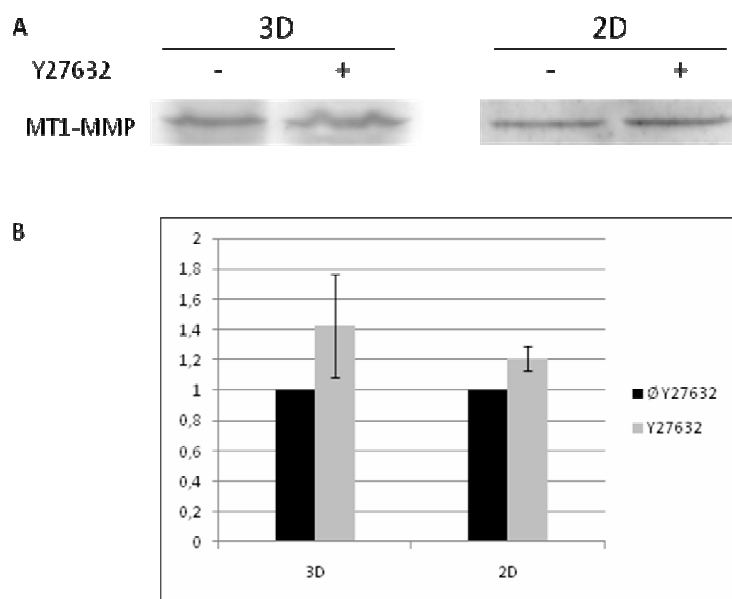
Dále jsme metodou Western blot detekovali hladinu exprese proteáz uPa a MT1-MMP. Vzorky byly získány jednak z 2D prostředí, a jednak z 3D matrigelových matricí. Po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 jsme pozorovali zvýšenou hladinu exprese uPa jak ve 2D prostředí, tak i v 3D prostředí (obr.21). Zatímco buňky kultivované v 3D matrici vykazovaly vyšší zastoupení pro-formy uPa než buňky kultivované ve 2D prostředí. uPa je serinová proteáza, která je syntetizována jako proenzym. Po navázání pro-uPa na receptor uPAR je tato proteáza aktivována (Schmitt *et al.*, 1992).



Obr.21. Imunoblotty uPa o velikosti 55 kDa (pro-forma) a 33 kDa (aktivní forma) a jejich kvantifikace. Hladina exprese pro-formy i aktivní formy uPa byla po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 mírně zvýšena jak v 3D prostředí, tak i ve 2D prostředí. A) Reprezentativní imunoblotty pro-formy a aktivní formy uPa. B) Densitometrická kvantifikace pro-formy uPa. Densitometrická kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Image Quant TL 5.0. Data byla získána ze dvou nezávislých pokusů v přítomnosti (+) a nepřítomnosti (-) inhibitoru Y27632. Kvantifikace pro-formy uPa v přítomnosti Y27632 je zobrazena jako násobek kvantifikace pro-formy uPa v nepřítomnosti inhibitoru Y27632. Statistické ověření spolehlivosti dat bylo získáno na základě dvouvýběrového Studentova t-testu.

MT1-MMP je membránově vázaná matrixová metaloproteáza, která se v buňce vyskytuje jako enzymaticky neaktivní 64 kDa velká pro-forma. Tato pro-forma MT1-MMP je enzymaticky štěpena na katalyticky aktivní enzym o velikosti 55 kDa (Yana a Weiss, 2000). Po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem

Y27632 došlo k nepatrnému zvýšení aktivní formy MT1-MMP v 3D i v 2D prostředí (obr.22).



Obr.22. Imunoblotty aktivní formy MT1-MMP o velikosti 55 kDa a jejich kvantifikace. Množství aktivní formy MT1-MMP bylo po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 velice slabě zvýšeno jak v 3D prostředí, tak i ve 2D prostředí. A) Reprezentativní imunoblotty aktivní formy MT1-MMP. B) Densitometrická kvantifikace aktivní formy MT1-MMP. Densitometrická kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Image Quant TL 5.0. Data byla získána ze tří nezávislých pokusů v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) inhibitoru Y27632. Kvantifikace aktivní formy MT1-MMP v přítomnosti Y27632 je zobrazena jako násobek kvantifikace MT1-MMP v nepřítomnosti inhibitoru Y27632. Statistické ověření spolehlivosti dat bylo získáno na základě dvouvýběrového Studentova t-testu.

Diskuse

K *in vitro* analýze améboidně-mezenchymálního přechodu jsme zvolili vysoce metastatickou buněčnou linii melanomových buněk A375M2. V kolagenových matricích 75 % buněk A375M2 vykazuje kulatou morfologii. K indukci améboidně-mezenchymálního přechodu jsme zvolili inhibitor Y27632, který inhibuje améboidní invazivitu závislou na Rho/ROCK signalizaci a indukuje améboidně-mezenchymální přechod invazivity u buněk A375M2 (Sahai a Marshall, 2003).

Naším cílem bylo získat proteomickou analýzu améboidně-mezenchymálního přechodu, který je oproti mezenchymálně-améboidnímu přechodu méně prostudovaný. Proteomickou analýzu jsme provedli z buněk kultivovaných v 3D prostředí, neboť z literatury vyplývá, že migrace buněk se liší ve 2D a 3D prostředí (Sahai a Marshall, 2003; Sahai *et al.*, 2007; Torka *et al.*, 2006). V literatuře jsme nenašli žádný způsob, jak šetrně rozpustit kolagenové matrice, aniž bychom ovlivnili fyziologický stav buněk. Museli jsme tedy přistoupit k práci s matrigelovými matricemi, které lze rozpustit komerčně dostupným rozpouštědlem při 4°C.

Nejdříve jsme optimalizovali podmínky práce s matrigelovými matricemi, pro indukci améboidně-mezenchymálního přechodu přidáním inhibitoru kinázy ROCK Y27632. Zjistili jsme, že morfologie A375M2 buněk po působení inhibitoru Y27632 záleží v matrigelové matici na mnoha faktorech a jejich kombinacích. Záleží na přítomnosti růstových faktorů, na koncentraci matrigelu, koncentraci séra (FBS), na koncentraci inhibitoru Y27632, na pořadí přidání inhibitoru Y27632, na době inkubace buněk s inhibitorem Y27632 a na koncentraci buněk. Z našich dat vyplývá, že morfologie buněk A375M2 a améboidně-mezenchymální přechod indukovaný inhibitorem Y27632 je závislý na vlastnostech okolní matrice. Závislost morfologie a migrace buněk na architektuře extracelulární hmoty byla už dříve pozorována (Provenzano *et al.*, 2008; Van Goethem *et al.*, 2010). Velká výhoda použití matrigelových maticí spočívá v uniformní morfologii A375M2 buněk v nepřítomnosti inhibitoru Y27632, zastoupení buněk kulaté morfologie je 100% a výsledky tedy nejsou ovlivněny výskytem buněk protáhlé morfologie.

Proteomickou analýzou jsme získali 92 proteinů, u kterých se vlivem indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina exprese. A 51 proteinů, u kterých se po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 změnila hladina fosforylace. Pouze u 17 proteinů byla změněna hladina exprese jak v 2D, tak i v 3D prostředí. A pouze 8 proteinů mělo shodně změněnou fosforylací v obou prostředích. Tato data ukazují na velmi odlišné chování buněk v 2D a 3D prostředí.

Ověřili jsme zvýšenou hladinu fosforylace kofilinu 2 na serinu 3 u A375M2 buněk kultivovaných v 3D prostředí po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632. Hladina fosforylace kofilinu 2 se v buňkách kultivovaných ve 2D prostředí po indukci AMT inhibitorem Y27632 nemění. Kofilin se v buňce vyskytuje ve dvou izoformách (kofilin 1 a kofilin 2), které vykazují 80 % sekvenční homologii a mají shodné všechny funkční domény (Thirion *et al.*, 2001). Kofilin 2 podléhá alternativnímu sestřihu, v buňce se vyskytují dvě sestřihové formy kofilinu 2 (Thirion *et al.*, 2001). Transkript kofilinu 2b je přítomen především v srdci a skeletárním svalstvu. Transkript kofilinu 2a je přítomen v různých tkáních (Thirion *et al.*, 2001). Funkce kofilinu je studována především na izoformě 1. Kofilin je F-aktin degradující protein, který generuje + konce aktinových filament, umožňuje tak lokální polymeraci aktinu a tím podporuje buněčnou migraci. Fosforylace kofilinu na serinu 3 zamezuje vazbě kofilinu na aktinová vlákna (Moriyama *et al.*, 1996). Fosforylace kofilinu neinhibuje migraci buněk ba naopak, fosforylace kofilinu je současně pozorována se zvýšenou aktivitou kofilinu a se schopností buněk migrovat (Chan *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2006). Globální zvýšení fosforylace kofilinu je tedy nezbytné pro chemotaxi buněk (Mouneimne *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006). Zvýšení celkové hladiny fosforylovaného kofilinu je doprovázeno lokální defosforylací kofilinu na vedoucím okraji buňky. Tato lokální aktivace kofilinu je důležitá pro polarizaci buňky a pro pohyb buňky za gradientem chemoatraktantů (Mouneimne *et al.*, 2006). Dále fosforylace kofilinu na serinu 3 kinázou LIMK přispívá k tvorbě stresových vláken regulovaných Rho signalizací důležitých pro mezenchymální invazivitu (Sumi *et al.*, 2001).

Ověřili jsme zvýšenou hladinu exprese β -kateninu u buněk kultivovaných v 3D prostředí, u buněk kultivovaných ve 2D prostředí se hladina tohoto proteinu nemění. β -katenin zajišťuje v buňce mnoho funkcí. Zprostředkovává spojení kadherinů

s buněčným cytoskeletem a je tudíž důležitý pro kontakt buňky s buňkou (Knudsen *et al.*, 1995) a kolektivní invazivitu. Z literatury vyplývá, že β -katenin se regulace migrace neúčastní pouze regulací adhezivních spojů, ale existují zde i jiné mechanismy regulace migrace, do kterých je β -katenin zapojen. Cytoplazmatická lokalizace β -kateninu je přísně regulována a epitelo-mezenchymální přechod invazivity nádorových buněk je spojen s relokací β -kateninu do jádra (Eger *et al.*, 2000). Další funkcí β -kateninu je regulace genové exprese. β -katenin se nezúčastňuje pouze transkripční aktivace fyziologických procesů (Clevers, 2006), β -katenin se účastní i regulace transkripce vedoucí k epitelo-mezenchymálnímu přechodu (Kim *et al.*, 2002; Stemer *et al.*, 2008). Funkce β -kateninu jako transkripčního faktoru je regulována kinázou GSK3, která fosforyluje cytoplazmatický β -katenin a cílí ho do proteasomu (shrnutí v Xu *et al.*, 2009). Možný vliv GSK3 na AMT jsme testovali pomocí LiCl, který působí jako nespecifický inhibitor GSK3. Ukázalo se, že inhibice GSK3 pomocí LiCl nevede v 3D kolagenových maticích ke změně morfologie A375M2 buněk.

Otázkou je, jakou roli hraje β -katenin v améboidně-mezenchymálním přechodu melanomových buněk A375M2. Vzhledem k tomu, že působení inhibitoru LiCl nezpůsobovalo změnu morfologie u A375M2 buněk lze předpokládat, že β -katenin se v rámci AMT účastní spíše regulace adhezivity než regulace genové exprese. Zajímavé bude zjištění, jestli je β -katenin po indukci AMT nabohacen v jádře a účastní se tak regulace genové exprese, nebo jestli je lokalizován v cytoplazmě a účastní se migrace jiným způsobem.

Proteomickou analýzou jsme zjistili, že hladina fosforylace PKC α na Ser657 je po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 snížena. Snížení míry fosforylace bylo pozorováno jak v 2D prostředí, tak v 3D prostředí. Následnou imunoblot analýzou jsme potvrdili snížení hladiny fosforylace PKC α na Ser657 pouze v 3D prostředí. Fosforylace Ser657 je odrazem aktivace kinázy PKC α . Ukázali jsme dále, že PKC α je důležitá pro améboidní morfologii, protože její inhibice vede k indukci améboidně-mezenchymálního přechodu. Zastoupení protáhlých buněk po inhibici PKC α inhibitorem Gö6976 závisí na koncentraci tohoto inhibitoru. Nejvyšší účinek na změnu morfologie buněk A375M2 měla 1 μ M koncentrace inhibitoru Gö6976. Po 24 hodinách téměř 60 % buněk vykazovalo protáhlou morfologii. 0,2 μ M koncentrace inhibitoru Gö6976 měla nižší účinnost na změnu morfologie A375M2 buněk. Překvapivě 5 μ M koncentrace inhibitoru Gö6976 morfologii buněk neovlivňovala. Při

této koncentraci převažovalo zastoupení kulatých buněk. Po 48 hodinách se počet protáhlých buněk v přítomnosti všech koncentrací inhibitoru Gö6976 snížil. Proč dochází po dlouhodobém působení inhibitoru Gö6976 ke snížení počtu protáhlých buněk je otázkou. Navýšení počtu buněk kulaté morfologie po 48 hodinách se nezdá být vlivem zvýšeného zastoupení apoptotických buněk.

Možným vysvětlením vlivu PKC α na améboidní migraci může být fakt, že PKC α spolu s kinázou ROCK1 fosforylují RhoE neboli Rnd3 (Riento *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2009). Fosforylace RhoE vede ke změně lokalizace RhoE z membrány do cytosolu (Riento *et al.*, 2005), kde RhoE způsobuje rozpad stresových vláken (Riento *et al.*, 2003; Riento *et al.*, 2005). RhoE se přímo váže na ROCK1 a tím inhibuje fosforylační funkci ROCK kinázy (Riento *et al.*, 2003). Fosforylace RhoE pomocí PKC α a ROCK1 vede ke zvýšení Rho/ROCK signalizace, neboť se kináza ROCK1 lokalizována v membráně dostane z dosahu působení RhoE (Madigan *et al.*, 2009). Fosforylace RhoE reguluje améboidní migraci dvěma způsoby. Jednak podporuje rozpad stresových vláken důležitých pro mezenchymální invazivitu, a jednak aktivuje Rho/ROCK signalizaci. Je možné, že PKC α v buňkách A375M2 se účastní regulace améboidní migrace právě tímto způsobem. Snížení aktivity PKC α zjištěné proteomickou analýzou zároveň s inhibovanou aktivitou kinázy ROCK inhibitorem Y27632 může ovlivňovat míru fosforylace RhoE. Snížení hladiny fosforylace RhoE ovlivní lokalizaci tohoto proteinu a v membráně poté inhibuje Rho/ROCK závislou aktomyosinovou kontraktilitu. Zároveň nepřítomnost RhoE v cytoplazmě blokuje na RhoE závislý rozpad stresových vláken důležitých pro mezenchymální invazivitu.

Fosfo-specifickou protilátkou PKC α (Ser657) od Santa Cruz Biotechnology se nám bohužel nepodařilo detekovat specifický proužek odpovídající nativní formě PKC α . Detekovali jsme však silný proužek velikosti cca 50 kDa. U vzorků z 3D prostředí v přítomnosti 50 μ M inhibitoru Y27632 vykazoval tento proužek snížení oproti kontrole bez přidaného Y27632. Toto snížení fosforylace fragmentu PKC α odpovídalo datům získaným proteomickou analýzou. Vzorky z 2D prostředí nevykazovaly výrazné snížení míry fosforylace v přítomnosti 10 μ M inhibitoru Y27632. V apoptotických buňkách je PKC α proteolyticky štěpena kalpainem na fragment o velikosti 46 kDa (Touyarot *et al.* 2000; Leverrier *et al.*, 2002). Předpokládáme, že námi detekovaný, silný proužek o velikosti přibližně 50 kDa je právě tímto fragmentem aktivované PKC α . Proteolytická aktivace PKC α kalpainem je spojená s translokací PKC α k plazmatické membráně (Hong *et al.*, 1995). Tento konstitutivně aktivní fragment PKC α neindukuje uvolňování

cytochromu c z mitochondrií a neindukuje ani aktivaci kaspázy-3 jako jiné konstitutivně aktivní fragmenty izoform PKC (Leverrier *et al.* 2002). Tento aktivní fragment PKC α má tedy pravděpodobně jiné funkce než indukci apoptózy, například zmíněnou fosforylaci RhoE. Vyšší zastoupení fosforylovaného aktivního fragmentu PKC α než fosforylované nativní formy PKC α , které jsme pozorovali pomocí metody Western blot, může být i buněčně specifické.

Z dat získaných proteomickou analýzou vyplývá, že indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 ovlivňuje některé členy MAPK signální dráhy. Z proteomické analýzy však nebylo jasné, zda pozorované změny ukazují spíše na aktivaci nebo spíše na inhibici MAPK signální dráhy při AMT. Zjistili jsme však, že inhibitor PD 98059, který inhibuje MAPKK ovlivňuje zastoupení jednotlivých typů morfologií A375M2. Po 24 hodinách 35 % buněk vykazovalo protáhlou morfologii. Po 48 hodinách se zastoupení protáhlých buněk téměř nezměnilo, ale zvýšil se počet buněk s intermediální morfologií. Zastoupení kulatých buněk po 48 hodinách bylo pouze 30 %. Naše výsledky tedy ukazují, že inhibice MAPK signální dráhy indukuje AMT v A375M2 buňkách.

Mezenchymální invazivita je na rozdíl od invazivity améboidní závislá na proteolýze ECM. Proto nás zajímalo, jestli indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 u A375M2 buněk povede ke zvýšenému uvolňování extracelulárních proteáz, které jsou nezbytným předpokladem pro efektivnost mezenchymální migrace. Zvýšenou produkci extracelulárních proteáz lze detekovat pomocí zymografických metod. Standardní zymografické metody však umožňují testování buněk pouze v 2D prostředí. Ukázali jsme, že přestože přidání Y27632 k A375M2 buňkám vede k morfologickým změnám směrem k mezenchymálnímu fenotypu, ke zvýšené degradaci želatinu ani ke zvýšené produkci MMP do media nedochází. U buněk pěstovaných v 3D matrigelu, však dojde k mírnému zvýšení exprese membránové metaloproteázy MT1-MMP a plasminogenového aktivátoru (uPa). Tento výsledek naznačuje, že v 3D prostředí by indukcí AMT u A375M2 buněk mohlo docházet i ke zvýšení schopnosti degradovat ECM. Tuto možnost by však potvrdili až zymografie provedené v 3D prostředí.

Abychom získali globální představu o signálních drahách, kterých se proteomickou analýzou získané proteiny účastní, vytvořili jsme signální diagramy pomocí databáze KEGG (viz. příloha 2).

U buněk kultivovaných v 3D i 2D prostředí byla zvýšená exprese kinázy PAK3. Ačkoli nebyla popsána aktivace kinázy LIMK pomocí kinázy PAK3, vysoká sekvenční homologie a shodné biochemické vlastnosti s PAK1 a PAK2 nevylučují tuto regulaci (Zhao a Manser, 2005). Tato regulace je pak možným vysvětlením zvýšené hladiny fosforylovaného kofilinu 2 u buněk kultivovaných v 3D prostředí. Ačkoliv u buněk kultivovaných ve 2D prostředí je kromě PAK3 zvýšená exprese kinázy PAK1 a PAK2, zvýšená míra fosforylace kofilinu 2 není pozorována. Tento fakt ukazuje na rozdílnost chování buněk ve 2D a 3D prostředí, a nutnost pracovat s 3D maticemi při studiu buněčné migrace.

Ačkoliv kináza FAK reguluje tvorbu fokálních adhezí nezbytnou pro mezenchymální migraci, hladina fosforylace Tyr577 je snížena u buněk kultivovaných ve 2D i 3D prostředí. Tyr576 a 577 jsou lokalizovány v katalytickém centru kinázy a jejich fosforylace je nezbytná pro plnou aktivaci kinázy (Parson, 2003). Kináza FAK je defosforylována fosfatázou PTEN. Hladina exprese fosfatázy PTEN je u A375M2 buněk kultivovaných ve 2D prostředí snížena. U buněk kultivovaných v 3D prostředí je zvýšená hladina fosforylace fosfatázy PTEN na serinech 380, 382 a 385, fosforylace těchto serinu vede ke snížení aktivity fosfatázy PTEN a její relokizaci z plazmatické membrány (Tamguney a Stokoe, 2007). Defosforylace kinázy FAK na Tyr577 pravděpodobně není způsobena aktivitou fosfatázy PTEN.

U buněk kultivovaných ve 2D i 3D prostředí je po indukci AMT zvýšená hladina fosforylace kinázy FAK na Ser910. Tento Ser910 moduluje vazebnou schopnost proteinů na kinázu FAK (Parson, 2003). Kináza FAK na Ser910 je fosforylována mimo jiné kinázou Erk5 (Villa-Murozzi, 2007), jejíž exprese je u A375M2 buněk po indukci AMT zvýšena v 2D i 3D prostředí. Fosforylace kinázy FAK na Ser910 reguluje adhezivitu buněk, morfologii buněk a s tím související cytoskelet, přesný mechanismus působení zatím není znám (Villa-Murozzi, 2007).

Fosforylace kinázy FAK na serinových zbytcích současně s defosforylací na tyrosinových zbytcích je pozorováno během mitózy (Ma *et al.*, 2001). Data získaná proteomickou analýzou a signální dráhy vytvořené databází KEGG však nenaznačují zvýšené zastoupení mitotických buněk.

Z KEGG vizualizace signálních kaskád vyplývá, že by část buněk v 3D prostředí mohla mít zastaven buněčný cyklus v G1 fázi (viz. příloha 2, Buněčný cyklus). V A375M2 buňkách je po indukci AMT zvýšená fosforylace kinázy Chk2 na Thr68, tato fosforylace je zajišťována kinázou ATM, která je aktivována poškozením DNA. Dále je snížena hladina cyklinu E, který je nezbytný pro vstup buněk do S fáze buněčného cyklu. Buňky kultivované ve 3D prostředí mají po indukci AMT zvýšenou hladinu kinázy Plk1. Kromě toho, že kináza Plk1 reguluje procesy související s mitotickou fází buněčného cyklu, obnovuje zastavení buněčného cyklu v důsledku poškození DNA (shrnutí v van Vugt a Medema, 2005).

A375M2 buňky kultivované ve 2D prostředí mají po indukci AMT sníženou hladinu cyklinu B1, který je důležitý pro vstup buňky do mitotické fáze. Buňky mají zvýšenou fosforylaci proteinu Rb na Ser807. Tato pozice je jedním z míst fosforylace Rb, která vede k aktivaci E2F transkripčního faktoru. U buněk kultivovaných ve 2D prostředí je zvýšena fosforylace SMC1 proteinu na Ser957. SMC1 je na Ser957 fosforylován kinázou ATM. Fosforylovaná forma SMC1 je důležitá pro buněčné přežívání, stabilitu chromozomů během poškození DNA a blokuje vstup buněk do S fáze (Yazdi *et al.*, 2002; Kinagawa *et al.*, 2004). Ovšem hladina exprese Chk1, jejíž fosforylace vede k zastavení vstupu buněk do S fáze, je v A375M2 buňkách po indukci AMT snížena.

Jedním z proteinů, u kterého byla snížena hladina exprese po indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 v 3D prostředí, je kináza PDK1. Tato kináza se podílí na regulaci améboidní migrace. Lokalizuje kinázu ROCK1 do plazmatické membrány a blokuje vazbu inhibičního proteinu RhoE na ROCK1 (Pinner a Sahai, 2008). Snížení exprese PDK1 u buněk vykazující améboidní invazivitu vede k améboidně-mezenchymálnímu přechodu (Pinner a Sahai, 2008).

Indukce améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 u A375M2 buněk vede ke zvýšení hladiny exprese proteinu p27. Ke zvýšení hladiny exprese p27 dochází ve 2D prostředí. V 3D prostředí se to s určitostí nedá tvrdit, protože odchylka od průměru normalizovaných hodnot intenzity fluorescence byla 88%. Protein p27 se podílí na regulaci mezenchymální invazivity stabilizací mikrotubulů. Protein p27 váže

destabilizační protein mikrotubulů stathmin a tím ho inhibuje (Baldassarre *et al.*, 2005). Ztráta p27 vede k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Baldassarre *et al.*, 2005).

U A375M2 buněk kultivovaných ve 2D prostředí je snižená exprese proteinu IAP (inhibitor of apoptosis protein 1), je snižená fosforylace Bad proteinu na Ser918, zvýšená exprese proteinu Bax a prokaspázy 4, všechny tyto skutečnosti vedou k apoptóze. Na druhou stranu je snižená hladina proapoptotického proteinu Bak a zvýšená exprese Bcl-xS/L, což jsou antiapoptotické znaky.

U buněk kultivovaných ve 3D prostředí je situace podobná. Je snižená fosforylace Bad proteinu na Ser918, která vede k aktivaci apoptózy. Další proapoptotický znak je zvýšená hladina exprese prokaspázy 6 a 4. Stejně jako ve 2D prostředí je zvýšená hladina exprese antiapoptotického proteinu Bcl-xl a snižená exprese proapoptotického proteinu Bak. Tato data naznačují, že 50 μ M koncentrace inhibitoru Y27632 použitá při kultivaci buněk A375M2 v 3D prostředí a 10 μ M koncentrace inhibitoru Y27632 použitá při kultivaci buněk A375M2 v 2D prostředí mají na apoptózu podobný účinek. Zajímavým jevem je, že jsou současně pozorovány jak proapoptotické, tak antiapoptotické znaky (viz. příloha 2, Apoptóza).

Schopnost nádorových buněk využívat jak améboidní, tak i mezenchymální způsob invazivity je významnou komplikací léčby nádorového onemocnění. K účinné léčbě rakoviny povede pravděpodobně až inhibice obou způsobů invazivity. Proto je nesmírně důležité přesné pochopení obou těchto způsobů invazivit a především pochopení mechanismů, kterými buňky přepínají mezi těmito dvěma způsoby invazivit.

Závěr

- Podařilo se optimalizovat podmínky pro indukci améboidně-mezenchymálního přechodu inhibitorem Y27632 u melanomových buněk linie A375M2 v 3D matrigelu.
- Podařilo se zavést protokol pro rozpouštění matrigelových maticí a získání buněk z 3D prostředí.
- Získali jsme proteomickou analýzu améboidně-mezenchymálního přechodu indukovaného inhibitorem Y27632 ve 2D a 3D prostředí.
- Ověřili jsme signifikantnost některých výsledků proteomické analýzy.
- Ukázali jsme, že kináza PKC α je důležitá pro améboidní migraci a její inhibice vede k indukci améboidně-mezenchymálního přechodu.
- Zjistili jsme, že kultivace A375M2 buněk v 3D kolagenu s inhibitorem kinázy MAPKK PD 98059 vede k AMT, což ukazuje na účast MAPK signální dráhy v AMT/MAT.
- Ukázali jsme, že aktivita proteáz se ve 2D prostředí po indukci AMT inhibitorem Y27632 nemění. Aktivitu proteáz jsme u buněk kultivovaných ve 3D prostředí nezjišťovali, ale hladina exprese proteáz v buňkách z 3D prostředí byla v porovnání s buňkami kultivovanými v 2D prostředí vyšší.

Seznam použité literatury

Aimes R.T., Quigley J.P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 270(11), 5872-6.

Amano M., Chihara K., Kimura K., Fukata Y., Nakamura N., Matsuura Y., Kaibuchi K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 275(5304), 1308-11.

Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., Kaibuchi K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271(34), 20246-9.

Bagri A., Tessier-Lavigne M., Watts R.J. (2009). Neuropilins in tumor biology. *Clin Cancer Res.* 15(6), 1860-4.

Baldassarre G., Belletti B., Nicoloso M.S., Schiappacassi M., Vecchione A., Spessotto P., Morrione A., Canzonieri V., Colombatti A. (2005). p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell.* 7(1), 51-63.

Belkin A.M., Akimov S.S., Zaritskaya L.S., Ratnikov B.I., Deryugina E.I., Strongin A.Y. (2001). Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 276(21), 18415-22.

Belletti B., Nicoloso M.S., Schiappacassi M., Berton S., Lovat F., Wolf K., Canzonieri V., D'Andrea S., Zucchetto A., Friedl P., Colombatti A., Baldassarre G. (2008). Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential. *Mol Biol Cell.* 19(5), 2003-13.

Berton S., Belletti B., Wolf K., Canzonieri V., Lovat F., Vecchione A., Colombatti A., Friedl P., Baldassarre G. (2009). The tumor suppressor functions of p27(kip1) include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Mol Cell Biol.* 29(18), 5031-45.

Besson A., Gurian-West M., Schmidt A., Hall A., Roberts J.M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* 18(8), 862-76.

Birkedal-Hansen H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 7(5), 728-35.

Bode W., Maskos K. (2003). Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem.* 384(6), 863-72.

Brábek J., Mierke C.T., Rösel D., Veselý P., Fabry B. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Communication and Signaling* (In press).

Bretscher A., Edwards K., Fehon R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(8), 586-99.

Brooks P.C., Stromblad S., Sanders L.C., von Schalscha T.L., Aimes R.T., Stetler-Stevenson W.G., Quigley J.P., Cheresch D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 85(5), 683-93.

Calderwood D.A., Zent R., Grant R., Rees D.J., Hynes R.O., Ginsberg M.H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem.* 274(40), 28071-4.

Carrier M.F., Ducruix A., Pantaloni D. (1999). Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol.* 6(9), R235-40.

Carragher N.O., Walker S.M., Scott Carragher L.A., Harris F., Sawyer T.K., Brunton V.G., Ozanne B.W., Frame M.C. (2006). Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene.* 25(42), 5726-40.

Cau J., Hall A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci.* 118(12), 2579-87.

Cazaubon S., Bornancin F., Parker P.J. (1994). Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha. *Biochem J.* 301(Pt2), 443-8.

Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127(3), 469-80.

Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A., Olson M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 3(4), 339-45.

Cunningham C.C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol.* 129(6), 1589-99.

Curmi P.A., Gavet O., Charbaut E., Ozon S., Lachkar-Colmerauer S., Manceau V., Siavoshian S., Maucuer A., Sobel A. (1999). Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct.* 24(5), 345-57.

Curmi P.A., Noguès C., Lachkar S., Carelle N., Gonthier M.P., Sobel A., Lidereau R., Bièche I. (2000). Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer.* 82(1), 142-50.

- Devreotes P.N., Zigmond S.H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol.* 4, 649-86.
- Dharmawardhane S., Brownson D., Lennartz M., Bokoch G.M. (1999). Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 66(3), 521-7.
- Dodelet V.C., Pasquale E.B. (2000). Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene.* 19(49), 5614-9.
- Eger A., Stockinger A., Schaffhauser B., Beug H., Foisner R. (2000). Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol.* 148(1), 173-88.
- Frankel P., Pellet-Many C., Lehtolainen P., D'Abaco G.M., Tickner M.L., Cheng L., Zachary I.C. (2008). Chondroitin sulphate-modified neuropilin 1 is expressed in human tumour cells and modulates 3D invasion in the U87MG human glioblastoma cell line through a p130Cas-mediated pathway. *EMBO Rep.* 9(10), 983-9.
- Friedl P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1), 14-23.
- Friedl P., Bröcker E.B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 57(1), 41-64.
- Friedl P., Borgmann S., Brocker E.B. (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol.* 70(4), 491-509.
- Friedl P., Gilmour D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(7), 445-57.
- Friedl P., Noble P.B., Shields E.D., Zanker K.S. (1994). Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA^{high} and CD45RO^{high} CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in threedimensional collagen lattices. *Immunology.* 82(4), 617-24.
- Friedl P., Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 3(5), 362-74.
- Friedl P., Zanker K.S., Brocker E.B. (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrity function. *Microsc Res Tech.* 43(5), 369-78.
- Franco S.J., Rodgers M.A., Perrin B.J., Han J., Bennin D.A., Critchley D.R., Huttenlocher A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol.* 6(10), 977-83.

Gadea G., de Toledo M., Anguille C., Roux P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA/ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol.* 178(1), 23-30.

Gadea G., Lapasset L., Gauthier-Rouviere C., Roux P. (2002). Regulation of Cdc42-mediated morphological effects: a novel function for p53. *EMBO J.* 21(10), 2373-82.

Gadea G., Sanz-Moreno V., Self A., Godi A., Marshall C. J. (2008). DOCK10 mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol.* 18(19), 1456-65.

Gysin S., Imber R. (1997). Phorbol-ester-activated protein kinase C- α lacking phosphorylation at Ser657 is down-regulated by a mechanism involving dephosphorylation. *Eur J Biochem.* 249(1), 156-60.

Guo F., Debidda M., Yang L., Williams D.A., Zheng Y. (2006). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem.* 281(27), 18652-9.

Hagerty L., Weitzel D.H., Chambers J., Fortner C.N., Brush M.H., Loisel D., Hosoya H., Haystead T.A. (2007). ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J Biol Chem.* 282(7), 4884-93.

He Z., Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell.* 90(4), 739-51.

Hegerfeldt Y., Tusch M., Brocker E.B., Friedl P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 62(7), 2125-30.

Hong D.H., Huan J., Ou B.R., Yeh J.Y., Saido T.C., Cheeke P.R., Forsberg N.E. (1995). Protein kinase C isoforms in muscle cells and their regulation by phorbol ester and calpain. *Biochim Biophys Acta.* 1267(1), 45-54.

Chan A.Y., Bailly M., Zebda N., Segall J.E., Condeelis J.S. (2000). Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol.* 148(3), 531-42.

Charras G., Paluch E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(9), 730-6.

Charras G.T., Hu C.K., Coughlin M., Mitchison T.J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol.* 175(3), 477-90.

Ishizaki T., Maekawa M., Fujisawa K., Okawa K., Iwamatsu A., Fujita A., Watanabe N., Saito Y., Kakizuka A., Morii N., Narumiya S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15(8), 1885-93.

Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., Narumiya S. (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 57(5), 976-83.

Keller H., Eggli P. (1998). Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil Cytoskeleton.* 41(2), 181-93.

Kim K., Lu Z., Hay E.D. (2002). Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int.* 26(5), 463-76.

Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 273(5272), 245-8.

Kinch M.S., Carles-Kinch K. (2003). Overexpression and functional alterations of the EphA2 tyrosine kinase in cancer. *Clin Exp Metastasis.* 20(1), 59-68.

Kitagawa R., Bakkenist C.J., McKinnon P.J., Kastan M.B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev.* 18(12), 1423-38.

Klein P.S., Melton D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(16), 8455-9.

Knudsen K.A., Soler A.P., Johnson K.R., Wheelock M.J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* 130(1), 67-77.

Kopfstein L., Christofori G. (2006). Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci.* 63(4), 449-68.

Kullander K., Klein R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(7), 475-86.

Lauffenburger D.A., Horwitz A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84(3), 359-69.

Lecuit T., Lenne P.F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(8), 633-44.

Leung T., Chen X.Q., Tan I., Manser E., Lim L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol.* 18(1), 130-40.

Leverrier S., Vallentin A., Joubert D. (2002). Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem J.* 368(Pt 3), 905-13.

- Lidke D.S., Lidke K.A., Rieger B., Jovin T.M., Arndt-Jovin D.J. (2005). Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J Cell Biol.* 170(4), 619-26.
- Ma A., Richardson A., Schaefer E.M., Parsons J.T. (2001). Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130^{CAS}. *Mol. Biol. Cell.* 12(1), 1-12.
- Maaser K., Wolf K., Klein C.E., Niggemann B., Zänker K.S., Bröcker E.B., Friedl P. (1999). Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin α 2 β 1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell.* 10(10), 3067-79.
- Madigan J.P., Bodemann B.O., Brady D.C., Dewar B.J., Keller P.J., Leitges M., Philips M.R., Ridley A.J., Der C.J., Cox A.D. (2009). Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C α -mediated phosphorylation. *Biochem J.* 424(1), 153-61.
- Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 285(5429), 895-8.
- Mandeville J.T., Lawson M.A., Maxfield F.R. (1997). Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol.* 61(2), 188-200.
- Manser E., Chong C., Zhao Z.S., Leung T., Michael G., Hall C., Lim L. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem.* 270(42), 25070-8.
- Miao H., Burnett E., Kinch M., Simon E., Wang B. (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2(2), 62-9.
- Mierke C.T., Rösel D., Fabry B., Brábek J. (2008). Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol.* 87(8-9), 669-76.
- Miki H., Suetsugu S., Takenawa T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17(23), 6932-41.
- Mishima T., Naotsuka M., Horita Y., Sato M., Ohashi K., Mizuno K. (2010). LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem Biophys Res Commun.* 392(4), 577-81.
- Montcourrier P., Mangeat P.H., Salazar G., Morisset M., Sahuquet A., Rochefort H. (1990). Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res.* 50(18), 6045-54.

- Moriyama K., Iida K., Yahara I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells*. 1(1), 73-86.
- Mouneimne G., DesMarais V., Sidani M., Scemes E., Wang W., Song X., Eddy R., Condeelis J. (2006). Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr Biol*. 16(22), 2193-205.
- Murphy G., Gavrilovic J. (1999). Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol*. 11(5), 614-21.
- Niggli V. (2003). Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways. *J Cell Sci*. 116(5), 813-22.
- Niggli V., Rossy. J. (2008). Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 40(3), 344-9.
- Niggli V., Schmid M., Nievergelt A. (2006). Differential roles of Rho-kinase and myosin light chain kinase in regulating shape, adhesion, and migration of HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 343(2), 602-8.
- Nishita M., Tomizawa C., Yamamoto M., Horita Y., Ohashi K., Mizuno K. (2005). Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol*. 171(2), 349-59.
- Nobes C.D., Hall A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81(1), 53-62.
- Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei M.G., Paris S., Hall A., Chardin P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*. 141(1), 187-97.
- Okano I., Hiraoka J., Otera H., Nunoue K., Ohashi K., Iwashita S., Hirai M., Mizuno K. (1995). Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J Biol Chem*. 270(52), 31321-30.
- Palazzo A.F., Eng C.H., Schlaepfer D.D., Marcantonio E.E., Gundersen G.G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*. 303(5659), 836-9.
- Palecek S.P., Loftus J.C., Ginsberg M.H., Lauffenburger D.A., Horwitz A.F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cellsubstratum adhesiveness. *Nature*. 385(6616), 537-40.
- Paluch E., Piel M., Prost J., Bornens M., Sykes C. (2005). Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys J*. 89(1), 724-33.

- Panková K., Rösel D., Novotný M., Brábek J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 67(1), 63-71.
- Parri M., Buricchi F., Giannoni E., Grimaldi G., Mello T., Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. (2007). EphrinA1 activates a Src/focal adhesion kinase-mediated motility response leading to rho-dependent actino/myosin contractility. *J Biol Chem.* 282(27), 19619-28.
- Parri M., Taddei M.L., Bianchini F., Calorini L., Chiarugi P. (2009). EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer Res.* 69(5), 2072-81.
- Parsons J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 116(Pt 8), 1409-16.
- Pinner S., Sahai E. (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol.* 10(2), 127-37.
- Provenzano P.P., Eliceiri K.W., Campbell J.M., Inman D.R., White J.G., Keely P.J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 4(1), 38.
- Provenzano P.P., Inman D.R., Eliceiri K.W., Trier S.M., Keely P.J. (2008). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCKdependent matrix reorganization. *Biophys J.* 95(11), 5374-84.
- Ramnath N., Creaven P.J. (2004). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep.* 6(2), 96-102.
- Ridley A.J. (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic.* 2(5), 03-10.
- Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70(3), 401-10.
- Riento K., Guasch R.M., Garg R., Jin B., Ridley A.J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol.* 23(12), 4219-29.
- Riento K., Totty N., Villalonga P., Garg R., Guasch R., Ridley A.J. (2005). RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 24(6), 1170-80.
- Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T., Kirschner M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 97(2), 221-31.
- Rösel D., Brábek J., Tolde O., Mierke C.T., Zitterbart D.P., Raupach C., Bicanová K., Kollmannsberger P., Panková D., Veselý P., Folk P., Fabry B. Up-regulation of

Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res.* 6(9), 1410-20.

Sabeh F., Shimizu-Hirota R., Weiss S.J. (2009). Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol.* 185(1), 11-9.

Sahai E., Marshall C.J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol.* 4(6), 408-15.

Sahai E., Marshall C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 5(8), 711-9.

Sahai E., Garcia-Medina R., Pouyssegur J., Vial E. (2007). Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol.* 176(1), 35-42.

Sanders L.C., Matsumura F., Bokoch G.M., de Lanerolle P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science.* 283(5410), 2083-5.

Sanz-Moreno V., Gadea G., Ahn J., Paterson H., Marra P., Pinner S., Sahai E., Marshall C. J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 135(3), 510-23.

Sanz-Moreno V., Marshall C.J. (2009). Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity *Cell Cycle* 8(10), 1484-1487.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.

Shea K.F., Wells C.M., Garner A.P., Jones G.E. (2008). ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells. *PLoS One.* 3(10), e3398.

Sheetz M.P., Felsenfeld D.P., Galbraith C.G. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 8(2), 51-4.

Schmidt S., Friedl P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 339(1), 83-92.

Schmitt M., Jänicke F., Moniwa N., Chucholowski N., Pache L., Graeff H. (1992). Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 373(7), 611-22.

Sidani M., Wessels D., Mouneimne G., Ghosh M., Goswami S., Sarmiento C., Wang W., Kuhl S., El-Sibai M., Backer J.M., Eddy R., Soll D., Condeelis J. (2007). Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol.* 179(4), 777-91.

Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 92(6), 735-45.

Song X., Chen X., Yamaguchi H., Mouneimne G., Condeelis J., Eddy R. (2006). Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 119(Pt 14), 2871-81.

Stemmer V., de Craene B., Berx G., Behrens J. (2008). Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene*. 27(37), 5075-80

Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S., Liotta L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 993(9), 541-73.

Suetsugu S., Miki H., Yamaguchi H., Obinata T., Takenawa T. (2001). Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J Cell Sci.* 114(24), 4533-42.

Sumi T., Matsumoto K., Nakamura T. (2001). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 276(1), 670-6.

Tamariz E., Grinnell F. (2002). Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol Biol Cell.* 13(11), 3915-29.

Tamguney T., Stokoe D. (2007). New insights into PTEN. *J Cell Sci.* 120(Pt 23), 4071-9.

Thirion C., Stucka R., Mendel B., Gruhler A., Jaksch M., Nowak K.J., Binz N., Laing N.G., Lochmüller H. (2001). Characterization of human muscle type cofilin (CFL2) in normal and regenerating muscle. *Eur J Biochem.* 268(12), 3473-82.

Tolde O., Rösel D., Veselý P., Folk P., Brábek J. (2010). The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur J Cell Biol.* 89(9), 674-80.

Torka R., Thuma F., Herzog V., Kirfel G. (2006). ROCK signaling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res.* 312(19), 3857-71.

Toshima J., Toshima J.Y., Takeuchi K., Mori R., Mizuno K. (2001). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem.* 276(33), 31449-58.

Totsukawa G., Wu Y., Sasaki Y., Hartshorne D.J., Yamakita Y., Yamashiro S., Matsumura F. (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol.* 164(3), 427-39.

Totsukawa G., Yamakita Y., Yamashiro S., Hartshorne D.J., Sasaki Y., Matsumura F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 150(4), 797-806.

Touyarot K., Poussard S., Verret C., Aragon B., Cottin P., Nogues X., Micheau J. (2000). Calpain-PKC inter-relations in mouse hippocampus: a biochemical approach. *Neurochem Res.* 25(6), 781-90.

Van Goethem E., Poincloux R., Gauffre F., Maridonneau-Parini I., Le Cabec V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol.* 184(2), 1049-61.

van Vugt M.A., Medema R.H. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene.* 24(17), 2844-59.

Vic Small laboratory website, Austrian Academy of Sciences in Salzburg and Vienna <http://cellix.imba.oeaw.ac.at/>

Villa-Moruzzi E. (2007). Targeting of FAK Ser910 by ERK5 and PP1 δ in non-stimulated and phorbol-ester-stimulated cells. *Biochem. J.* 408(1), 7-18.

Wang H.R., Ogunjimi A.A., Zhang Y., Ozdamar B., Bose R., Wrana J.L. (2006). Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase. *Methods Enzymol.* 406, 437-47.

Wang W., Mouneimne G., Sidani M., Wyckoff J., Chen X., Makris A., Goswami S., Bresnick A.R., Condeelis J.S. (2006). The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol.* 173(3), 395-404.

Watton S.J., Downward J. (1999). Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr Biol.* 9(8), 433-6.

Wei Y., Lukashev M., Simon D.I., Bodary S.C., Rosenberg S., Doyle M.V., Chapman H.A. (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* 273(5281), 1551-5.

Wilkinson S., Paterson H.F., Marshall C.J. (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol.* 7(3), 255-61.

Woodley D.T., Yamauchi M., Wynn K.C., Mechanic G., Briggaman R.A. (1991). Collagen telopeptides (cross-linking sites) play a role in collagen gel lattice contraction. *J Invest Dermatol.* 97(3), 580-5.

Wolf K., Friedl P. (2005). Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion. *Biochimie.* 87(3-4), 315-20.

Wolf K., Friedl P. (2006). Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol.* 154(1), 11-5.

Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U.H., Deryugina E.I., Strongin A.Y., Bocker E.B., Friedl P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 160(2), 267-77.

Wolf K., Wu Y.I., Liu Y., Geiger J., Tam E., Overall C., Stack M.S., Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 9(8), 893-904.

www.kinexus.ca

www.genome.jp/kegg/

Wyckoff J.B., Pinner S.E., Gschmeissner S., Condeelis J.S., Sahai E. (2006). ROCK and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion *in vivo*. *Curr Biol.* 16(15), 1515-23.

Xu C., Kim N.G., Gumbiner B.M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle.* 8(24), 4032-9.

Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. (2009). Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene.* 28(13), 1570-83.

Yamazaki D., Suetsugu S., Miki H., Kataoka Y., Nishikawa S., Fujiwara T., Yoshida N., Takenawa T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature.* 424(6947), 452-6.

Yana I., Weiss S.J. (2000). Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell.* 11(7), 2387-401.

Yanai M., Kenyon C.M., Butler J.P., Macklem P.T., Kelly S.M. (1996). Intracellular pressure is a motive force for cell motion in *Amoeba proteus*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 33(1), 22-9.

Yang L., Wang L., Zheng Y. (2006). Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 17(11), 4675-85.

Yang N., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 393(6687), 809-12.

Yazdi P.T., Wang Y., Zhao S., Patel N., Lee E.Y., Qin J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev.* 16(5), 571-82.

Yonemura S., Matsui T., Tsukita S., Tsukita S. (2002). Rho-dependent and independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides *in vivo*. J Cell Sci. 115(Pt 12), 2569-80.

Yoshida K., Soldati T. (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. J Cell Sci. 119(18), 3833-44.

Yumura S., Mori H., Fukui Y. (1984). Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. J Cell Biol. 99(3), 894-9.

Zaidel-Bar R., Cohen M., Addadi L., Geiger B. (2004). Hierarchical assembly of cellmatrix adhesion complexes. Biochem Soc Trans. 32(3), 416-20.

Zhao Z.S., Manser E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. Biochem J. 386(Pt 2), 201-14.

Příloha 1

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
PERP	Pan	p53-induced protein PIGPC1	13842	1	1405	7	0,10	16854	2	1938	3	0,12
HO1	Pan	Heme oxygenase 1	9701	8	2511	6	0,26	11593	16	3063	4	0,26
PKCa	S657	Protein-serine kinase C alpha	6668	0	2605	0	0,39	8716	21	2700	3	0,31
IRS1	Y1179	Insulin receptor substrate 1	5541	3	2350	4	0,42	10866	46	3532	13	0,33
FAK	Y577	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	8837	1	2602	5	0,29	9226	6	3065	15	0,33
Erk3	Pan	Extracellular regulated protein-serine kinase 3	1932	23	380	16	0,20	2708	44	1049	24	0,39
Bak	Pan	Bcl2 homologous antagonist/killer (BCK2L7)	3403	3	1207	3	0,35	3810	9	1497	6	0,39
Bad	S91	Bcl2-antagonist of cell death protein	8236	15	3907	3	0,47	8904	42	3943	2	0,44

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
AIF	Pan	Apoptosis inducing factor (PDCD8)	472	68	208	21	0,44	2939	28	1436	28	0,49
Mnk2	Pan	MAP kinase-interacting protein-serine kinase 2	1178	92	108	10	0,09	2059	22	671	26	0,33
p35	Pan	CDK5 regulatory subunit 1, p35	1065	13	38	98	0,04	1125	9	373	41	0,33
APG1	Pan	Hsp 70-related heat shock protein 1 (OSP94)	1750	27	172	99	0,10	2588	25	520	38	0,20
JNK2	Pan	Jun N-terminus protein-serine kinases 2 (SAPK2)	2629	1	3818	33	1,45	3088	27	592	18	0,19
PLCg1	Y783	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase γ -1	2953	4	1730	13	0,59	2732	0	759	20	0,28
BRCA1	S1497	Breast cancer type 1 susceptibility protein	1779	1	2617	7	1,47	7224	6	2402	2	0,33
BRCA1	S1423	Breast cancer type 1 susceptibility protein	1962	11	1730	2	0,88	4313	12	1511	1	0,35
PDK1	Pan	3-phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	5319	16	3727	35	0,75	6048	13	1403	10	0,38
4E-BP1	T45	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	2131	1	1815	1	0,85	4069	5	1585	10	0,39
TrkA	Pan	Nerve growth factor (NGF) receptor-tyrosine kinase	4531	8	3088	6	0,68	6811	3	2854	2	0,42
Pax2	S394	Paired box protein 2	1400	8	1288	6	0,92	1605	4	677	3	0,42

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
STAT3	Pan	Signal transducer and activator of transcription 3	6031	19	4846	23	0,80	8932	5	3878	17	0,43
PKCe	S729	Protein-serine kinase C ypsilon	2873	6	2422	3	0,84	4907	3	2157	10	0,44
GCK	Pan	Germinal centre protein-serine kinase	2408	27	2241	24	0,93	3123	1	1495	7	0,48
Cyclin E	Pan	Cyclin E1	4797	14	4646	28	0,97	6480	25	3207	12	0,49
STK33	Pan	FLJ35932 protein-serine kinase	3466	11	2849	5	0,82	5804	9	2926	2	0,50
TEK	Pan	Angiopoietin-1 receptor-tyrosine kinase	2879	2	2588	1	0,90	5119	1	2591	0	0,51
ErbB2	Y877	ErbB2 (Neu) receptor-tyrosine kinase	3901	18	5123	2	1,31	5339	3	2721	0	0,51
PCNA	Pan	Proliferating cell nuclear antigen	10037	23	1815	4	0,18	9628	52	2111	30	0,22
c-IAP1	Pan	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1	6416	33	466	36	0,07	2273	8	3122	1	1,37
Cyclin B1	Pan	Cyclin B1	1558	3	141	6	0,09	2825	2	2815	6	1,00
Ret	S696	Ret receptor-tyrosine kinase	12938	5	2158	3	0,17	3541	5	3222	7	0,91
PDGFRb	Y716	Platelet-derived growth factor receptor kinase beta	12819	5	2937	1	0,23	4453	7	3818	1	0,86
PKA R2a	S98	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type2 alpha	6755	20	2034	0	0,30	3046	3	1940	12	0,64
APG2	Pan	Hsp 70-related heat shock protein 4 (HSP70RY)	3046	2	939	31	0,31	2863	16	2534	22	0,89
MEK4	S80	MAPK/ERK protein-serine kinase 4 (MKK4, MAP2K4)	3845	1	1361	14	0,35	1872	4	1729	6	0,92
Histone H2A.X	S139	Histone H2A variant X	5066	6	1822	2	0,36	2589	3	1933	0	0,75
PKG1	Pan	Protein-serine kinase G1 (cGMP-dependent protein kinase)	6270	3	2396	4	0,38	6337	28	3670	15	0,58
Cyclin G1	Pan	Cyclin G1	1793	6	697	34	0,39	2175	3	1148	20	0,53
IRS1	S312	Insulin receptor substrate 1	3844	37	1539	14	0,40	3490	6	4311	27	1,24
eNos	T495	Nitric-oxide synthase, endothelial	9198	38	3853	0	0,42	4550	2	3517	3	0,77
DRAK1	Pan	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 1	8679	39	3687	3	0,42	5631	3	3123	15	0,55
S6Ka	T389	p70/p85 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	2470	0	1073	5	0,43	1466	8	1139	7	0,78
PKBa	Pan	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	4382	15	1906	25	0,43	3593	19	2141	27	0,60
Tyro10	Pan	Neurotrophic receptor-tyr. kinase of discoidin domain family	11127	10	4580	5	0,44	3681	15	5255	6	1,10
KDELreceptor1	Pan	ER lumen protein retaining receptor 1	6009	48	2696	5	0,45	3041	14	3058	6	1,06
DRAK2	Pan	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 2	6167	43	2776	8	0,45	4728	4	2875	12	0,61
Chk1	Pan	Checkpoint protein-serine kinase 1	1467	4	676	44	0,46	1402	10	1400	8	1,00

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
PTEN	Pan	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	2613	24	1224	21	0,47	3313	12	2674	17	0,81
AK2	Pan	Adenylate kinase 2	5888	6	2806	9	0,48	2999	3	2509	1	0,84
ACK1	Pan	Activated p21cdc42Hs protein-serine kinase	2127	4	1036	35	0,49	2578	8	1922	35	0,75
MEK3	S189	MAPK/ERK protein-serine kinase 3 (MKK3, MAP2K3)	3006	1	1521	2	0,51	3307	3	1707	13	0,52

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
MEK7	Pan	MAPK/ERK protein-serine kinase 7 (MKK7, MAP2K7)	258	35	670	13	2,60	2251	9	988	1	0,44

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
STAT1a/b	Pan	Signal transducer and activator of transcription 1 alpha	2530	3	8256	12	3,26	3907	9	12384	13	3,17
CaMK1g	Pan	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase 1 gamma	3665	2	6793	5	1,85	5988	5	13257	23	2,21
PKCg	T674	Protein-serine kinase C gamma	3385	4	5922	4	1,75	4826	4	10362	41	2,15
CASP4	Pan	Pro-caspase 4 (ICH2 protease, ICE(rel)-II)	2731	2	5761	2	2,11	3652	5	7826	22	2,14
RSK4	Pan	Ribosomal S6 protein-serine kinase 4 (alpha 6)	1882	1	3359	1	1,79	2233	2	4164	7	1,86
PAK3	Pan	p21-activated kinase 3 (beta) (serine/threonine-protein kinase)	229	35	782	13	3,41	1334	18	2343	22	1,76
4E-BP1	S65	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	1758	7	2931	0	1,67	2070	4	3630	22	1,75
Erk4 (Erk5)	Pan	Extracellular regulated protein-serine kinase 4	3419	2	6302	6	1,84	4879	4	8081	4	1,66
FAK	S910	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	2229	8	5231	9	2,35	3011	1	4892	6	1,62

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
SGK3	Pan	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	2185	6	3419	2	1,56	3099	3	5011	8	1,62
CDKL1	Pan	Cyclin-dependent kinase-like 1	1547	7	2609	10	1,69	1584	9	2544	2	1,61
CDK8	Pan	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	2189	4	4059	5	1,85	2735	7	4256	4	1,56
SOCS4	Pan	Suppressor of cytokine signalling 4 (SOCS7)	1855	4	2809	16	1,51	2414	7	3657	6	1,52
PP2A/Bg2	Pan	Protein-serine phosphatase 2A - B regulatory subunit- γ isoform	2624	1	4932	4	1,88	4349	7	6580	4	1,51
DAPK2	Pan	Death-associated protein kinase 2	3042	5	5541	13	1,82	3798	3	5722	24	1,51
PP2B/Aa	Pan	Protein-serine phosphatase 2B - catalytic subunit - α isoform	3895	3	6723	1	1,73	5224	5	7844	2	1,50
ZAP70/Syk	Y319/Y352	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase	1800	10	2955	5	1,64	2501	0	3725	1	1,49

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
PLCg2	Y753	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase γ -2	4006	35	6621	52	1,65	2426	16	3831	1	1,58
Catenin b	Pan	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1	5636	2	7774	11	1,38	4734	4	11243	1	2,37
MEK6	S207	MAPK/ERK protein-serine kinase 6 (MKK6, MAP2K6)	1827	8	2434	21	1,33	2004	12	4696	19	2,34
Cofilin 2	S3	Cofilin 2	2580	6	2704	3	1,05	3086	6	6960	22	2,26
MAPKAPK2	Pan	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	1556	29	1294	45	0,83	1818	33	3386	34	1,86
PKCq	T538	Protein-serine kinase C theta	1534	5	1567	6	1,02	1907	0	3392	38	1,78
Synapsin 1	S9	Synapsin 1 isoform Ia	2619	4	2978	26	1,14	2064	16	3668	16	1,78
CASP6	Pan	Pro-caspase 6 (apoptotic protease Mch2)	1731	1	1823	3	1,05	2412	6	4258	8	1,77
EGFR	T678	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	2355	19	1737	9	0,74	2285	3	4026	19	1,76
Tyk2	Pan	Protein-tyrosine kinase 2 (Jak-related)	1298	27	1718	42	1,32	2052	36	3597	25	1,75
EGFR	T693	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	3587	16	2426	5	0,68	2220	8	3811	18	1,72
CytoC	Pan	Cytochrome C	1670	23	2144	14	1,28	2279	17	3833	2	1,68
Plk1	Pan	Polo-like protein-serine kinase 1	4370	6	5291	6	1,21	6328	0	10460	22	1,65

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
SOX9	S181	SRY (sex determining region Y)-box 9	3807	9	5000	0	1,31	5497	2	8934	11	1,63
Integrin b1	S785	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta subunit, CD29 antigen)	2580	11	2692	7	1,04	4198	2	6719	31	1,60
NMDAR2B	Y1474	N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 2B subunit	1974	14	1541	0	0,78	2784	22	4451	30	1,60
Chk2	T68	Checkpoint protein-serine kinase 2	5687	0	5342	1	0,94	3103	8	4954	37	1,60
PKCe	Pan	Protein-serine kinase C epsilon	1525	19	1780	8	1,17	1905	12	3028	15	1,59
EphA1	Pan	Ephrin type-A receptor 1 protein-tyrosine kinase	3416	4	4183	4	1,22	4959	10	7867	1	1,59
Bcl-xL	Pan	Bcl2-like protein 1	19260	5	20397	14	1,06	11879	18	18760	1	1,58
PTEN	S380,S382, S385	Phosphatidylinositol-3,4,5-tri(P)-3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome10	5123	1	4812	7	0,94	5156	1	8091	3	1,57
hHR23B	Pan	UV excision repair protein RAD23 homolog B	3910	3	4031	2	1,03	6092	10	9513	33	1,56
PCTK1	Pan	PCTAIRE-1 protein-serine kinase	2533	2	3630	9	1,43	2930	4	4530	11	1,55
Rb	Pan	Retinoblastoma-associated protein 1	5083	8	4707	8	0,93	6559	3	10042	39	1,53
IRAK3	Pan	Interleukin 1 receptor-associated kinase 3	2507	3	3167	2	1,26	3095	8	4733	12	1,53
p27 Kip1	Pan	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	2651	14	4388	24	1,65	2010	88	4371	5	2,17
MKP1	Pan	MAP kinase phosphatase 1 (CL100, VH1)	981	12	2158	12	2,20	2144	49	3475	2	1,62
PKC <i>l</i> /i	Pan	Protein-serine kinase C lambda/iota	2177	10	3249	2	1,49	3855	37	2245	22	0,58
B23 (NPM)	S4	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)	1127	8	1684	1	1,50	1459	1	1464	6	1,00
MAK	Pan	Male germ cell-associated protein-serine kinase	3278	1	4913	2	1,50	3820	4	5622	5	1,47
RYK	Pan	RYK tyrosine-protein kinase	1859	0	2787	0	1,50	2971	3	3397	4	1,14
PRKAB1	Pan	5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), β -1regulatory subunit	2054	2	3085	1	1,50	2561	5	3315	1	1,29
I <i>k</i> B <i>β</i>	Pan	Inhibitor of NF-kappa-B beta	6233	14	9401	0	1,51	10405	15	10659	6	1,02
PP2A/A <i>α</i> /b	Pan	Protein-serine phosphatase 2A - A regulatory subunit - α a β	2162	3	4348	5	1,51	3028	1	5570	2	1,41
PP4/A'2	Pan	Protein-serine phosphatase 4 - regulatory subunit (PPX/A'2)	3343	20	5053	3	1,51	5397	0	6148	3	1,14
ERP57	Pan	ER protein 57 kDa	1130	7	1715	2	1,52	1688	9	1619	13	0,96
PAK2	Pan	p21-activated kinase 2 (gamma)	1695	35	2578	6	1,52	2563	8	3317	9	1,29
RafA	Pan	A-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	2111	1	3228	2	1,53	3729	2	4514	1	1,21
STAT5A	S780	Signal transducer and activator of transcription 5A	1941	1	2976	22	1,53	2793	8	3078	13	1,10

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
PP1/Ca	T320	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - alpha isoform	1801	7	2777	4	1,54	2462	3	2858	3	1,16
Smac/ DIABLO	Pan	Second mitochondria-derived activator of caspase	1648	2	2543	1	1,54	2341	12	3221	0	1,38
ANKRD3	Pan	Ankyrin repeat domain protein-serine kinase 3 (RIPK4, DIK)	2691	3	4181	10	1,55	3633	1	3835	6	1,06
Histone H3	S10	Histone H3.3	2159	3	3365	6	1,56	3661	7	3103	16	0,85
FLT4	Pan	Vascular endothelial growth factor receptor-protein-tyr-kinase 3	2079	5	3280	2	1,58	2917	1	3497	3	1,20
Vrk1	Pan	Vaccinia related protein-serine kinase 1	2203	2	3481	7	1,58	3004	1	3957	2	1,32
Vimentin	S33	Vimentin	1443	3	2302	4	1,60	1928	2	2605	11	1,35
Tau	S578	Microtubule-associated protein tau	4103	10	6566	26	1,60	6212	0	8848	1	1,42
mMOB1	Pan	Preimplantation protein 3	3689	3	5925	4	1,61	4620	5	4273	1	0,92
Fyn	Pan	Fyn proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	2745	2	4450	7	1,62	4778	15	5159	2	1,08
SMC1	S957	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2083	4	3384	5	1,62	2690	7	3825	1	1,42
WIP1	Pan	Protein phosphatase 1D	4166	30	6771	3	1,63	5160	7	6862	1	1,33
Rb	S807	Retinoblastoma-associated protein 1	2343	3	3818	1	1,63	4661	2	5186	5	1,11
PKCb1	Pan	Protein-serine kinase C beta 1	4363	0	7018	3	1,63	5656	6	8161	3	1,31
GroEL	Pan	GroEL homolog (may correspond to Hsp60)	1689	1	2755	1	1,63	2521	6	3003	23	1,19
PP6C	Pan	Protein-serine phosphatase 6 - catalytic subunit (PPVC)	3496	13	6624	0	1,65	5356	5	8090	3	1,31
GSK3a	S21/S9	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha	801	12	1327	3	1,66	1485	7	1324	3	0,89
PAK1	Pan	p21-activated kinase 1 (alpha) (serine/threonine-protein kinase)	1771	13	3349	2	1,67	3218	12	5036	8	1,37
PKA R2b	S114	cAMP-dependent protein-ser kinase regulatory type 2 subunit β	2166	10	3694	0	1,71	4092	4	4240	2	1,04
FGFR1	Pan	Fibroblast growth factor receptor-tyrosine kinase 1	2069	4	3569	5	1,72	2987	0	4175	0	1,40
ATF2	T71	Activating transcription factor 2 (CRE-BP1)	2230	7	3855	5	1,73	2976	1	3539	14	1,19
PKCd	S645	Protein-serine kinase C delta	3588	0	6310	29	1,76	5443	4	6199	30	1,14
eEF2K	Pan	Elongation factor-2 protein-serine kinase	1489	5	2658	0	1,78	2015	14	2899	2	1,44
S6Kb	Pan	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase beta	1496	1	2681	11	1,79	2606	2	2951	1	1,13
MEK3 (MAP2K3)	Pan	MAPK/ERK protein-serine kinase 3 (MKK3)	1306	21	3154	15	1,83	2620	31	3038	8	1,14
Bcl-xS/L	Pan	Bcl-xS/L	4507	8	8257	3	1,83	7959	5	7474	14	0,94
GRK2 (BARK1)	Pan	G protein-coupled receptor-serine kinase 2	797	21	1460	13	1,83	2095	9	1561	16	0,74

Protein	Typ protilátky/ místo fosforylace	Celý název proteinu	průměr i.f. 2D	% odchylka 2D	průměr i.f. 2DY	% odchylka 2DY	2DY/2D	průměr i.f. 3D	% odchylka 3D	průměr i.f. 3DY	% odchylka 3DY	3DY/3D
PRK1 (PKN1)	Pan	Protein kinase C-related protein-serine kinase 1	1860	14	3508	1	1,89	3518	11	4820	10	1,37
BMX (Etk)	Y40	Bone marrow X protein-tyrosine kinase	1138	7	2198	1	1,93	1437	7	2104	3	1,46
Bax	Pan	Apoptosis regulator Bcl2-associated X protein	4034	2	7982	7	1,98	6555	15	8234	1	1,26
Aurora C (AIK3)	Pan	Aurora Kinase C (serine/threonine-protein kinase 13)	2013	1	3997	4	1,99	2792	2	4135	7	1,48
GSK3b	Pan	Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	1211	19	2894	3	2,07	2780	7	3328	0	1,21
VEGFR2 (KDR)	Y1214	Vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase 2	2063	9	4354	36	2,11	3795	24	3607	0	0,95
EGFR	Y1197	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	2446	0	5488	2	2,24	2231	13	2983	13	1,34

Poznámka:

Typ protilátky/ místo fosforylace

- **Pan** = Pan-specifická protilátka detekující protein jako takový
- Fosfo-specifická protilátka detekující daný fosforylovaný epitop proteinu

i.f. = intenzita fluorescence

Y = inhibitor Y27632

2DY/2D = podíl signálu indukovaného přidáním Y27632 v 2D prostředí (odráží míru zvýšení (>1) resp. snížení (<1) exprese nebo fosforylace daného proteinu po přidání inhibitoru Y27632)

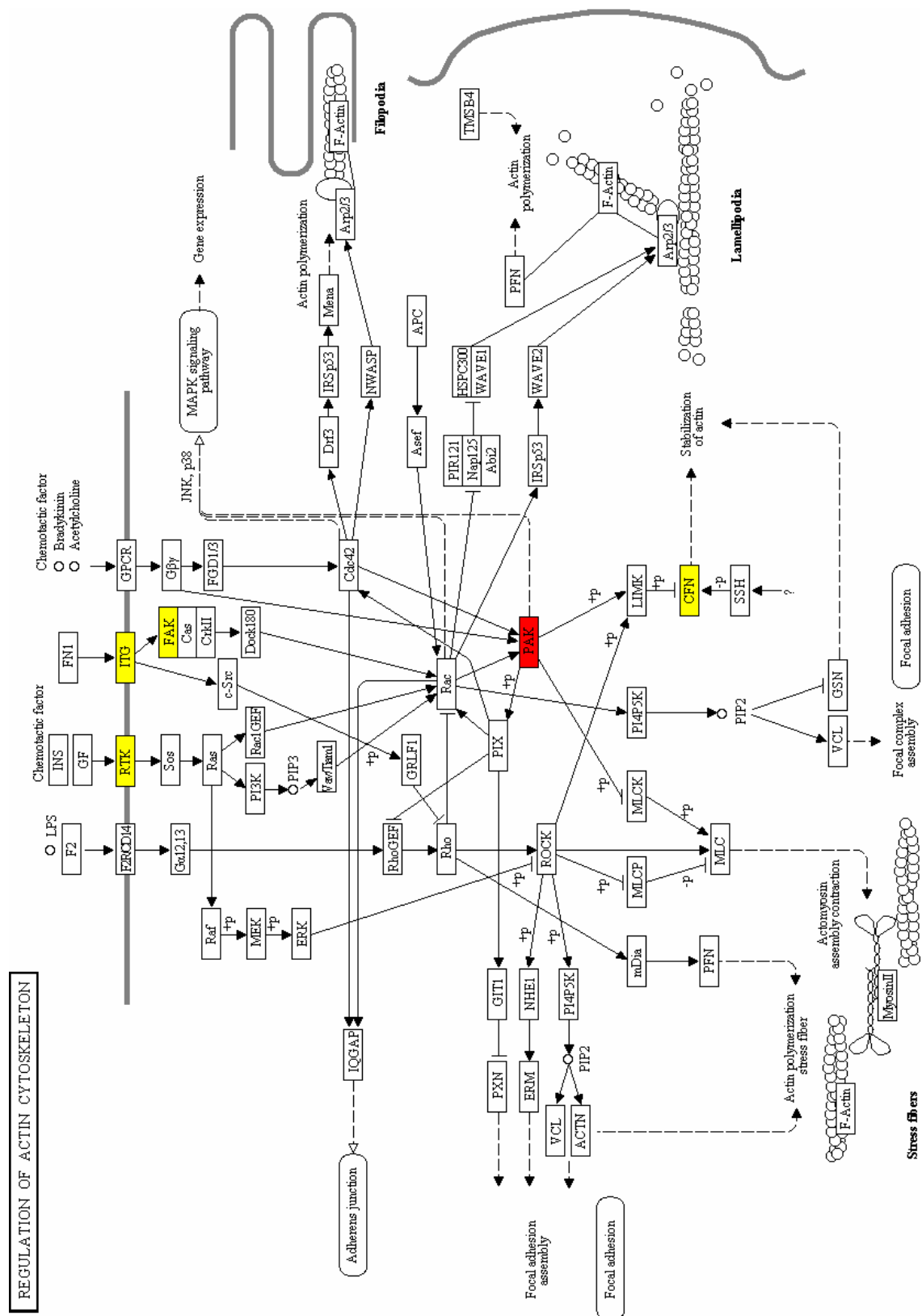
3DY/3D = podíl signálu indukovaného přidáním Y27632 v 3D prostředí

Příloha 2

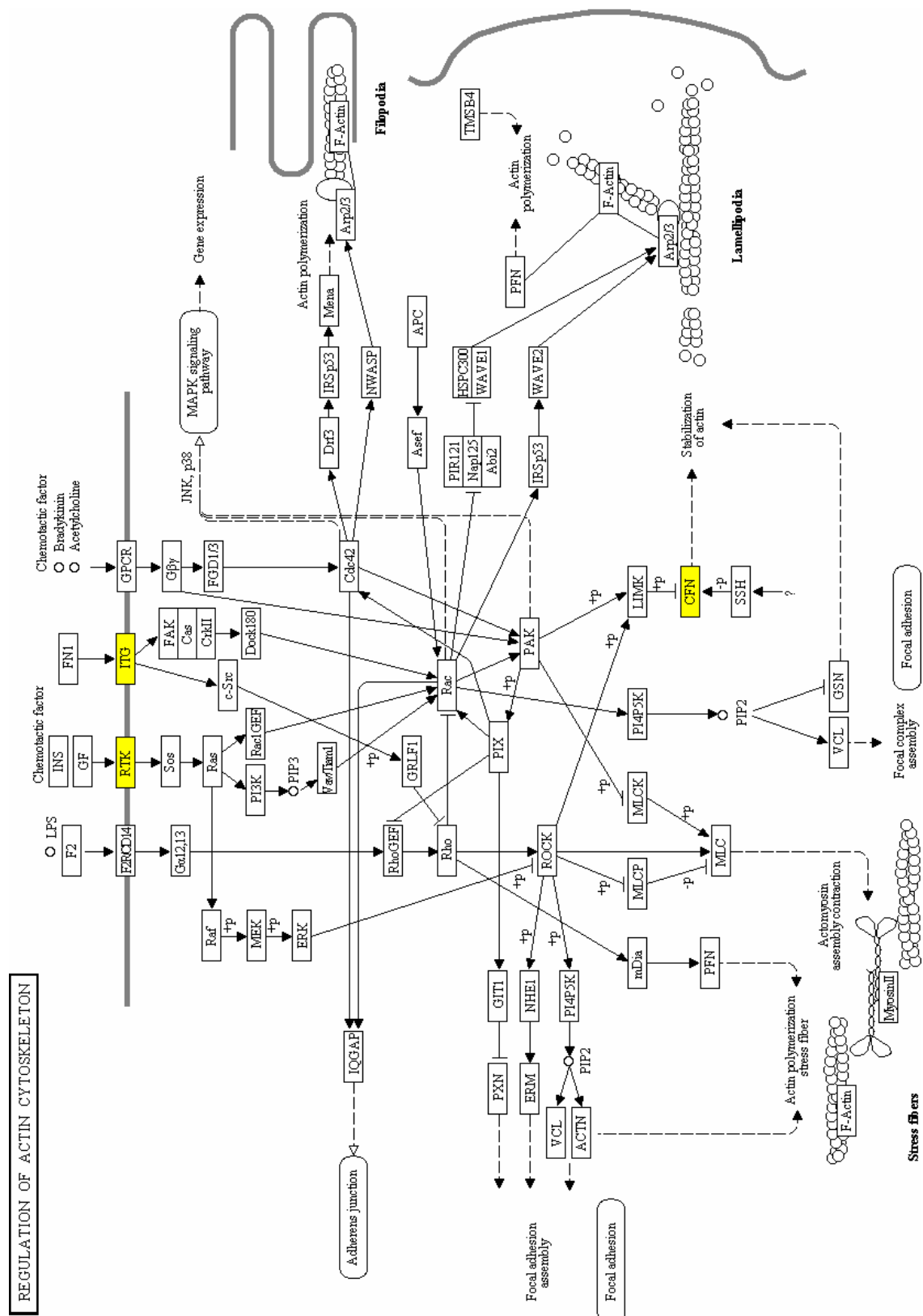
Signální kaskády byly získány pomocí KEGG databáze (www.genome.jp/kegg/). Do databáze jsme zadávali proteiny získané proteomickou analýzou A375M2 buněk kultivovaných v 3D prostředí, v 2D prostředí a proteiny, které se vyskytovaly pouze v 3D prostředí.

Pro označení proteinů nalezených KINEXUS microarray analýzou jsme vybrali následující barevné kódování:

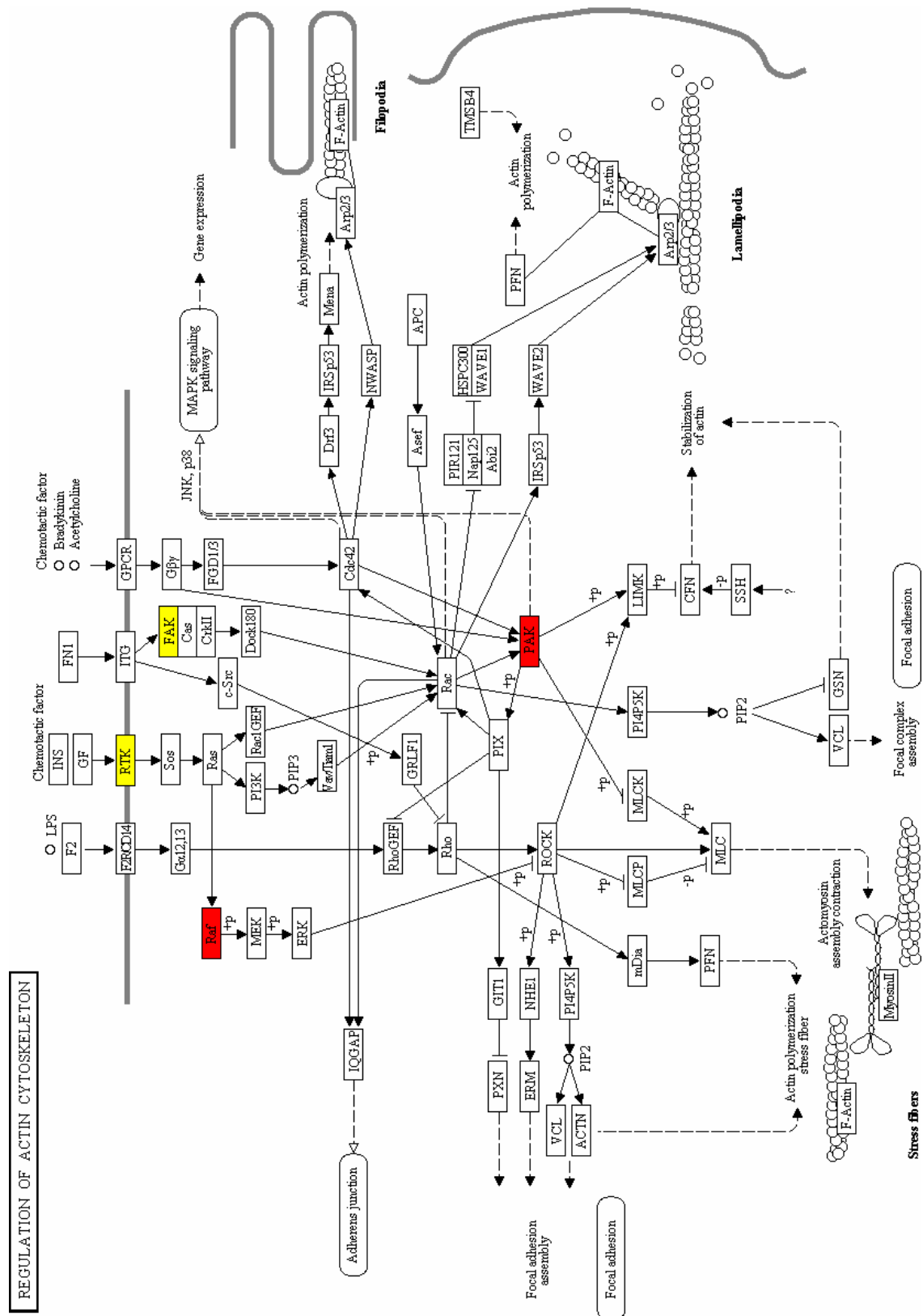
- Červená - zvýšená hladina exprese po indukci AMT
- Modrá - snížená hladina exprese po indukci AMT
- Žlutá - zvýšená hladina fosforylace po indukci AMT
- Zelená - snížená hladina fosforylace
- Šedá - označení PKC, neboť se v proteomických datech vyskytovala v několika izoformách, které se vzájemně lišily hladinou exprese a fosforylace



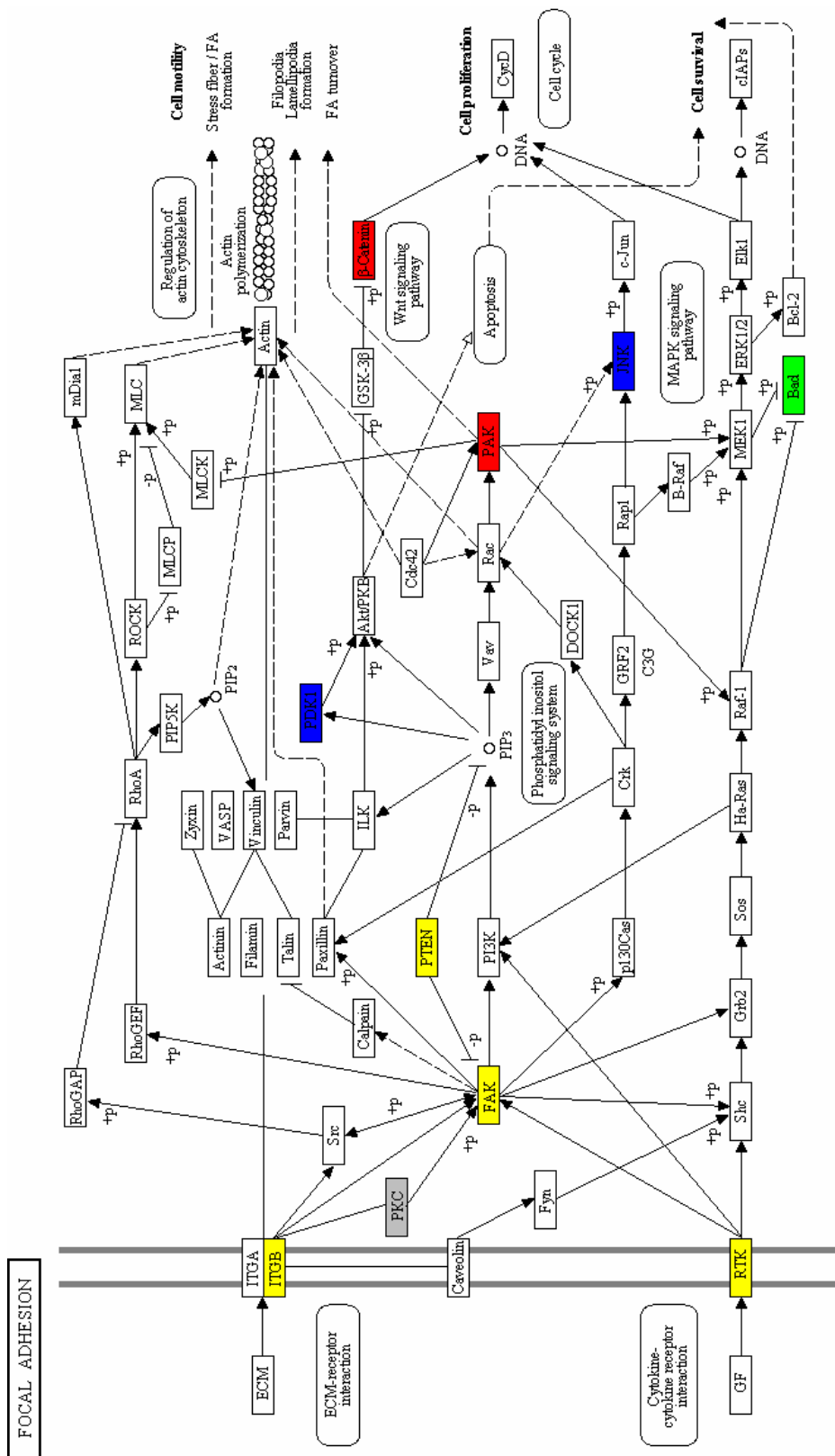
3D prostředí: **Regulace aktinového cytoskeletu**, (Kanehisa Laboratories)



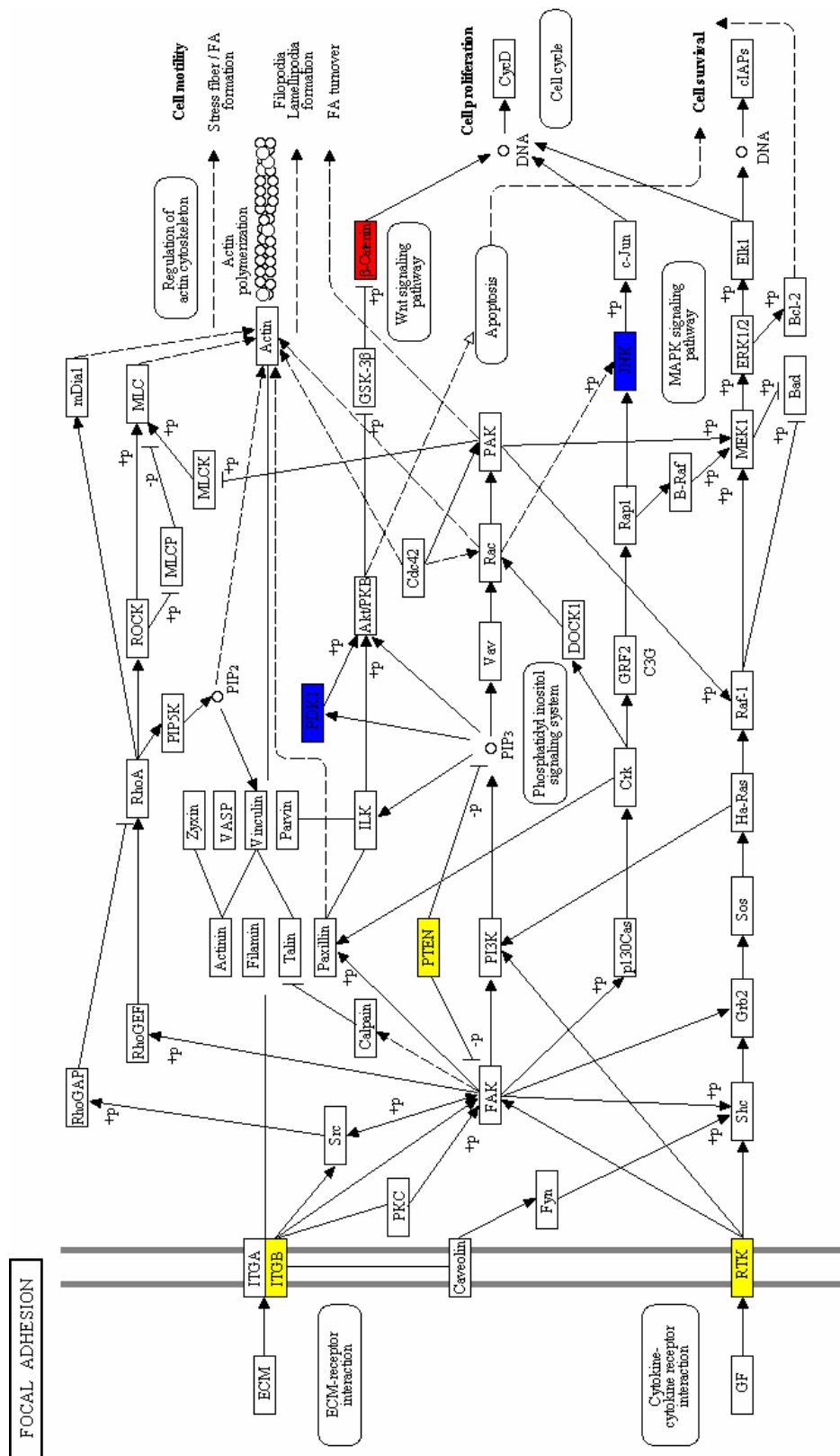
3D prostředí (proteiny pouze v 3D): **Regulace aktinového cytoskeletu**



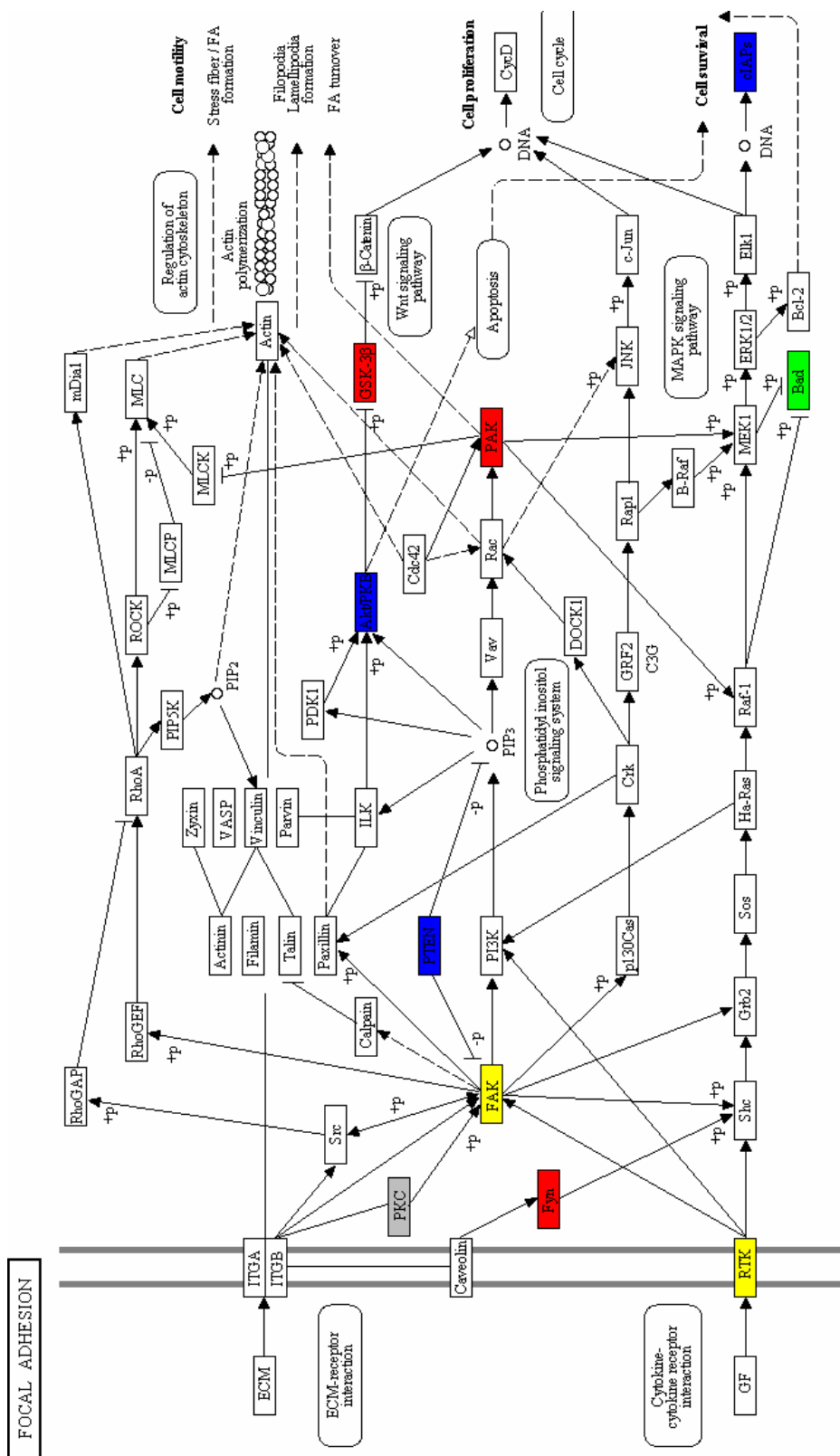
2D prostředí: Regulace aktinového cytoskeletu



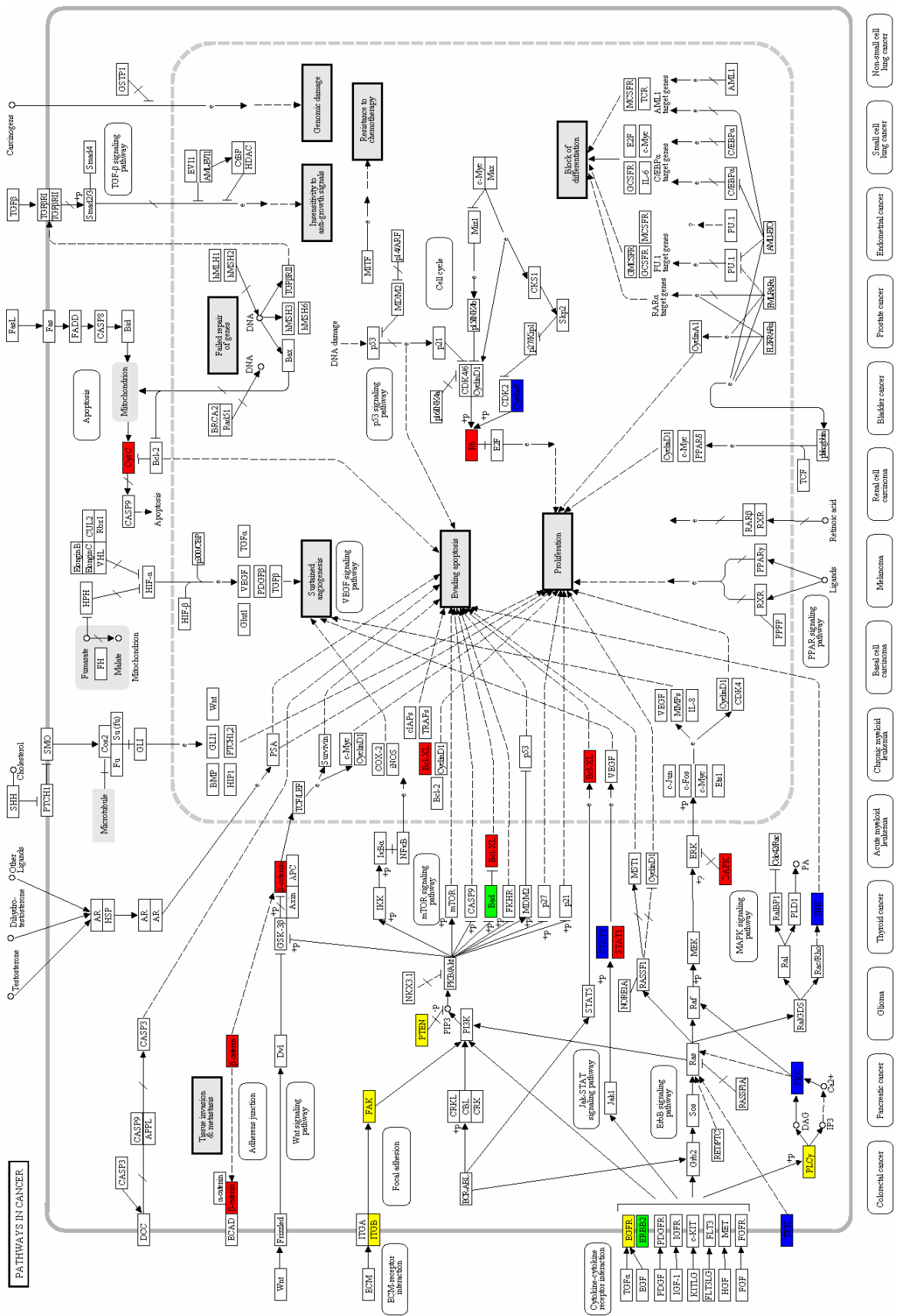
3D prostředí: **Regulace fokálních adhezí**, (Kanehisa Laboratories)



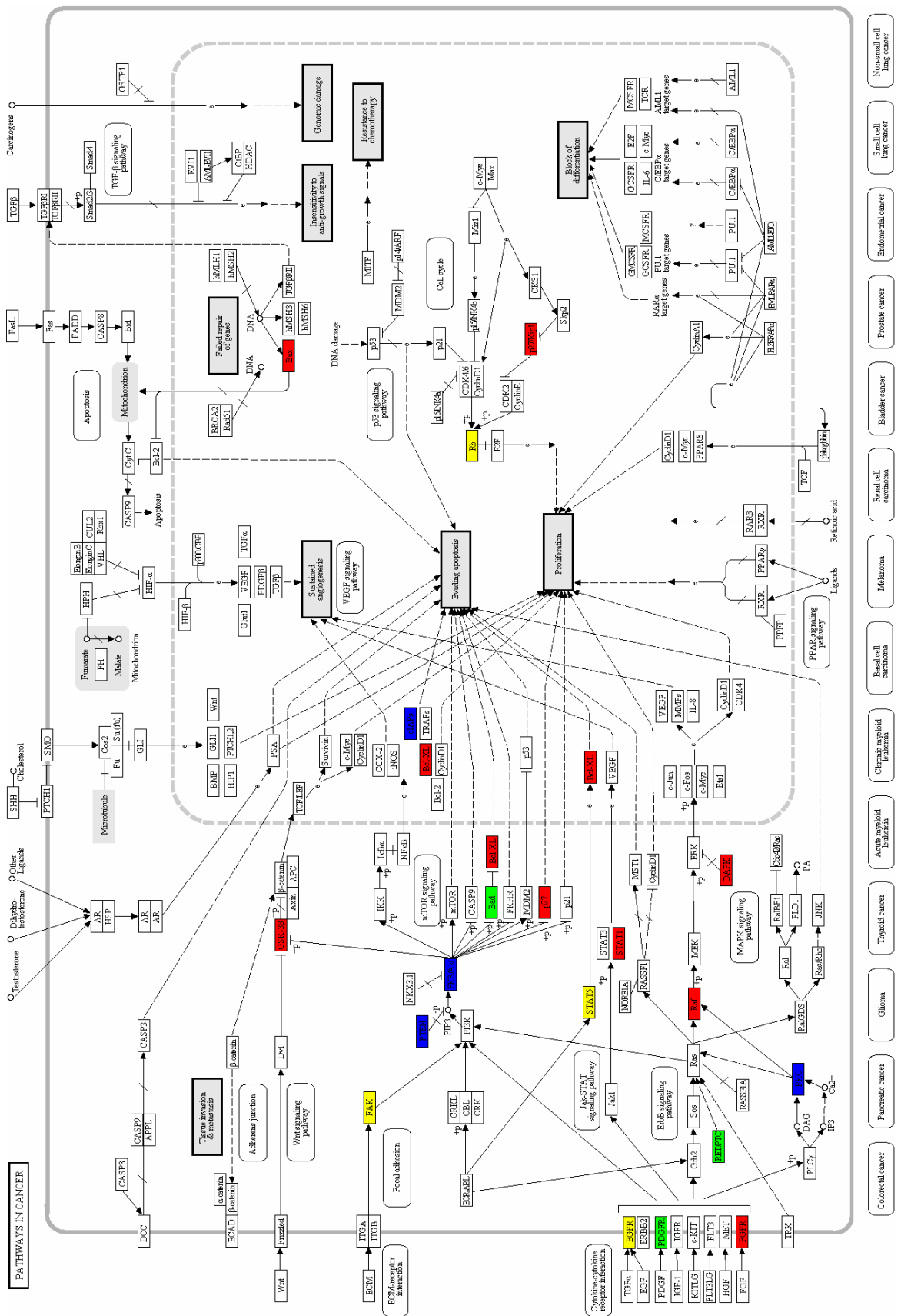
3D prostředí (proteiny pouze v 3D): **Regulace fokálních adhezí**



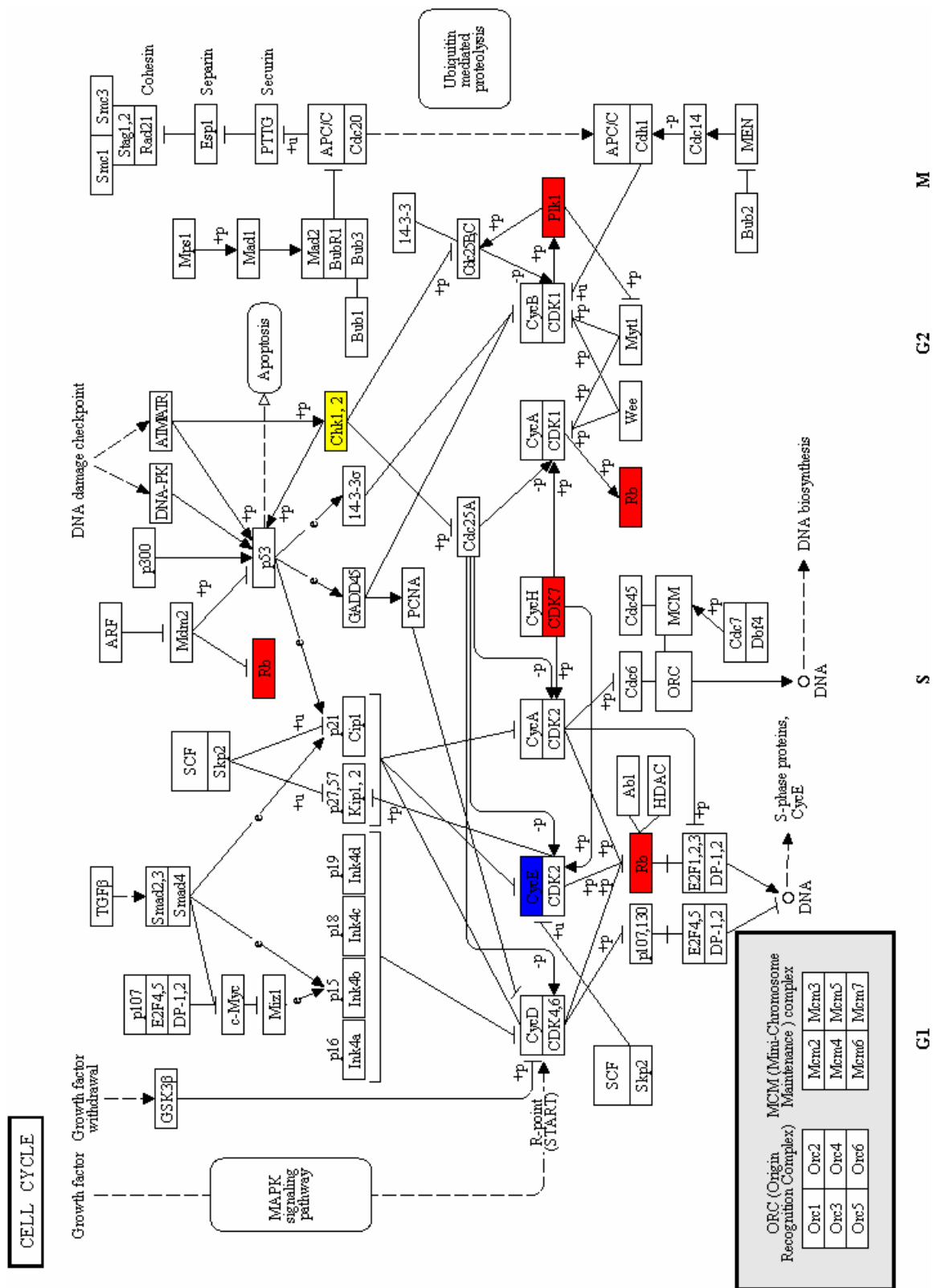
2D prostředí: Regulace fokálních adhezí



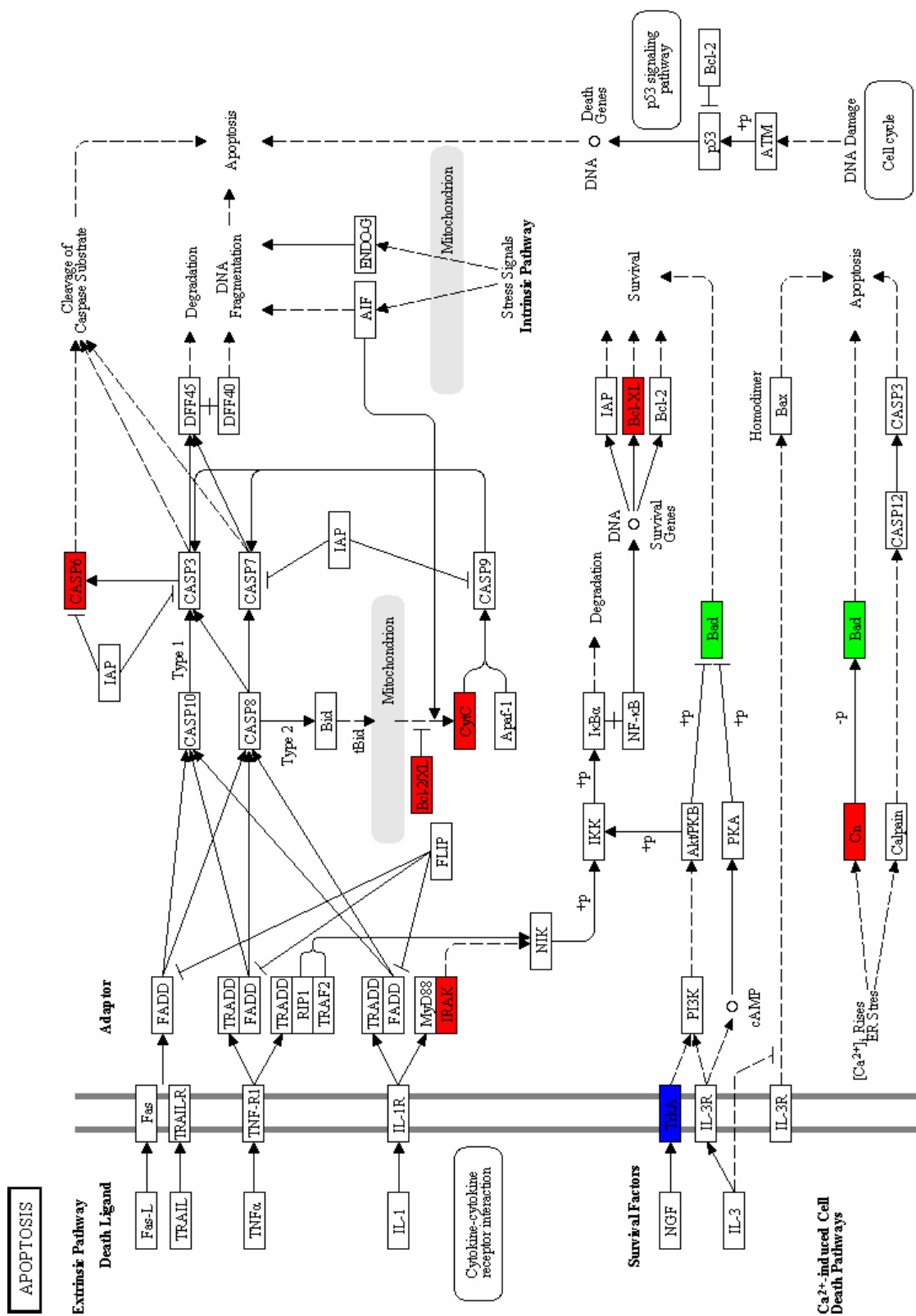
3D prostředí: Dráhy vedoucí ke vzniku rakoviny, (Kanehisa Laboratories)



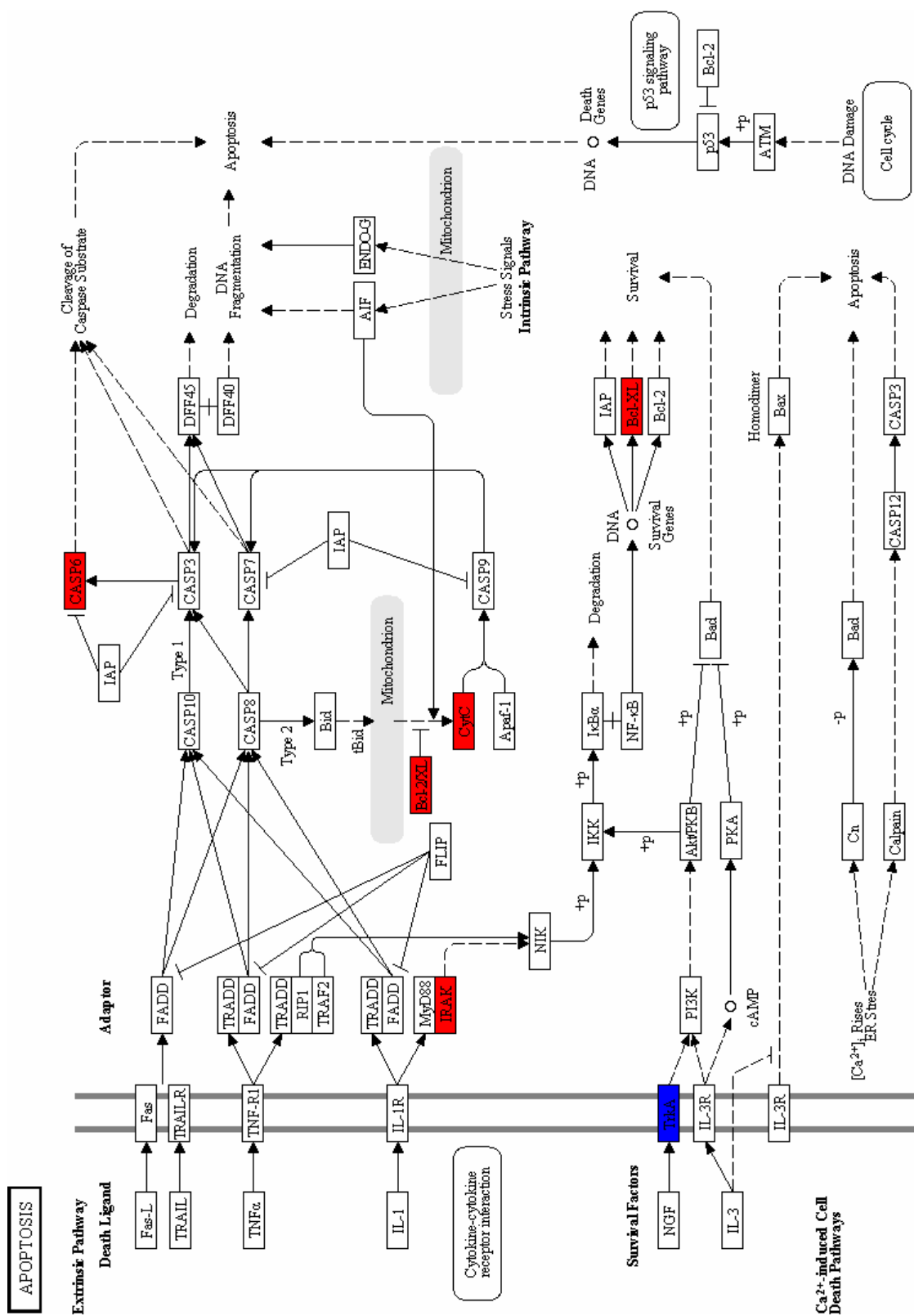
2D prostředí: Dráhy vedoucí ke vzniku rakoviny



3D prostředí (proteiny pouze v 3D): **Buněčný cyklus**



3D prostředí: **Apoptóza**, (Kanehisa Laboratories)



3D prostředí (proteiny pouze v 3D): **Apoptóza**

